

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA III

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD KILLER DE Pichia
membranifaciens CYC 1106: PRODUCCION Y
CARACTERIZACION BIOQUIMICA

TESIS DOCTORAL

ANTONIO SANTOS DE LA SEN

MADRID 1999

23071



BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD KILLER DE *Pichia*
***membranifaciens* CYC 1106: PRODUCCIÓN Y**
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA



X-53-367586-2

Memoria presentada por
ANTONIO SANTOS DE LA SEN
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Vº Bº, el Director del trabajo

Dr. Domingo Marquina Díaz

Madrid, 1999

	Página
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Las levaduras <i>killer</i>	1
1.2.- Clasificación de las levaduras <i>killer</i>	2
1.3.- Incidencia de las levaduras <i>killer</i>	4
1.4.- El sistema <i>killer</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.4.1.- RNAs de doble cadena (dsRNAs) en <i>S. cerevisiae</i>	7
1.4.1.1.- L _A -dsRNA	8
1.4.1.2.- L _B -dsRNA y L _C -dsRNA	9
1.4.1.3.- M-dsRNA	9
1.4.2.- Expresión, secreción e inmunidad	9
1.4.3.- El modelo de acción de las toxinas <i>killer</i>	12
1.4.3.1.- La pared como receptor primario de las toxinas <i>killer</i>	12
Estructura general de la pared celular en levaduras	12
1.4.3.2.- Composición química de la pared de las levaduras	13
1.4.3.3.- Acción de las toxinas <i>killer</i> sobre la pared celular	16
1.4.3.4.- La membrana plasmática como receptor secundario de las toxinas <i>killer</i>	16
1.5.- Detección de la actividad <i>killer</i> de levaduras	19
1.6.- Toxinas <i>killer</i> caracterizadas en levaduras	22
1.7.- Toxinas <i>killer</i> en el género <i>Pichia</i>	23
1.8.- Aplicaciones potenciales de las toxinas <i>killer</i>	25
1.8.1.- Empleo en la industria vitivinícola y de alimentación	25
1.8.2.- Aplicación terapéutica	27
1.8.3.- Aplicación en taxonomía	29
1.8.4.- Aplicación en manipulación genética	29
1.8.5.- Aplicación en biodeterioro	31
II.- OBJETIVOS	33
III.- MATERIAL Y METODOS	34
3.1.- Microorganismos	34
3.2.- Mantenimiento de los microorganismos	34
3.3.- Medios de cultivo	34
3.3.1.- Medio de mantenimiento: Medio YMA (<i>Yeast Morphology Agar</i>)	34
3.3.2.- Medio de detección de actividad <i>killer</i> : Medio YMA-MB (<i>YMA-Methylene Blue</i>)	35
3.3.3.- Medios para la producción de toxina <i>killer</i>	35
3.4.- Preparación de disoluciones tampón	38
3.5.- Valoración de proteínas y carbohidratos	38
3.6.- Determinación de la actividad <i>killer</i>	39
3.6.1.- Relación entre el diámetro de halo y las unidades arbitrarias de actividad <i>killer</i>	39
3.7.- Estudio de la cinética de producción de toxina <i>killer</i>	40
3.8.- Optimización de la producción de toxina <i>killer</i> en diferentes medios suplementados	40
3.9.- Actividad y estabilidad de la toxina <i>killer</i>	42
3.9.1.- Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad	

de la toxina <i>killer</i> .	42
3.9.1.1.- Efecto de la temperatura en la actividad.	42
3.9.1.2.- Efecto de la temperatura en la estabilidad.	42
3.9.2.- Efecto del pH en la actividad y estabilidad de la toxina <i>killer</i> .	42
3.9.2.1.- Efecto del pH en la actividad.	42
3.9.2.2.- Efecto del pH en la estabilidad.	43
3.9.3.- Efecto del NaCl y KCl en la actividad de la toxina <i>killer</i> .	43
3.9.4.- Estabilidad al pH y a la temperatura en presencia de NaCl.	43
3.9.4.1.- Estabilidad a la temperatura en presencia de NaCl.	43
3.9.4.2.- Estabilidad al pH en presencia de NaCl.	43
3.10.- Naturaleza de la actividad <i>killer</i> de <i>P. membranifaciens</i> .	44
3.11.- Determinación del punto isoelectrico (PI).	45
3.11.1.- Isoelectroenfoque preparativo.	45
3.11.1.1.- Preparación de los geles.	45
3.11.1.2.- Preparación de las muestras.	45
3.11.1.3.- Desarrollo del isoelectroenfoque.	46
3.11.1.4.- Determinación del punto isoelectrico.	46
3.11.2.- Isoelectroenfoque analítico.	46
3.11.2.1.- Formación de los geles.	46
3.11.2.2.- Preparación de las muestras.	46
3.11.2.3.- Procedimiento.	47
3.11.2.4.- Determinación del punto isoelectrico.	47
3.11.2.5.- Tinción de proteínas en geles de isoelectroenfoque analítico.	47
3.12.- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.	48
3.12.1.- Formación de los geles.	48
3.12.2.- Preparación de las muestras.	48
3.12.3.- Procedimiento.	49
3.12.4.- Tinción de proteínas en geles de electroforesis con Coomassie R-250.	49
3.12.5.- Tinción de glicoproteínas por el método del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS).	49
3.12.6.- Determinación de la masa molecular.	50
3.13.- Electroforesis de poliacrilamida en condiciones nativas.	50
3.13.1.- Formación de los geles.	51
3.13.2.- Preparación de las muestras.	51
3.13.3.- Procedimiento.	51
3.13.4.- Valoración de la actividad <i>killer</i> en los geles de poliacrilamida en condiciones nativas.	51
3.14.- Métodos de precipitación y concentración de proteínas.	52
3.14.1.- Ultrafiltración tangencial.	52
3.14.2.- Precipitación de proteínas.	52
3.14.2.1.- Precipitación fraccionada con etanol.	52
3.15.- Cromatografía de afinidad en β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano-epoxi-Sepharosa 6B.	53
3.16.- Estudio del receptor primario para la toxina <i>killer</i> en <i>Candida boidinii</i> .	53
3.16.1.- Obtención de paredes celulares de <i>Candida boidinii</i> .	53
3.16.2.- Obtención de glucanos de la pared.	54

3.16.3.- Obtención de manoproteínas.	56
3.16.4.- Extracción de quitina.	58
3.17.- Obtención de polisacáridos de diferente naturaleza.	59
3.17.1.- Obtención de pustulano del líquen <i>Umbilicaria pustulata</i> .	59
3.17.2.- Obtención de quitina de gamba.	59
3.17.2.1.- Preparación de quitina coloidal.	60
3.18.- Adsorción de la toxina a las fracciones de la pared.	60
3.18.1.- Especificidad de la capacidad de adsorción de la fracción P-1 de pared.	60
3.18.2.- Determinación de la adsorción de la toxina a la fracción P-1 en función del pH.	60
3.18.3.- Adsorción de la toxina a las fracciones tratadas con NaIO ₄ .	61
3.19.- Análisis químico de las fracciones de la pared por cromatografía gas-líquido.	61
3.19.1.- Hidrólisis ácida de las muestras.	61
3.19.2.- Preparación de derivados volátiles.	62
3.19.3.- Análisis de los derivados mediante cromatografía de gas-líquido (GLC).	62
3.20.- Análisis estructural de los glucanos de la pared de <i>C. boidinii</i> .	63
3.20.1.- Tratamiento con metaperiodato sódico.	63
3.20.2.- Valoración de la producción de ácido fórmico.	63
3.20.3.- Espectrofotometría de infrarrojos (IR).	64
3.20.4.- Resonancia magnética nuclear (¹ H-RMN).	65
3.21.- Obtención de protoplastos de <i>C. boidinii</i> IGC 3430.	65
3.22.- Cinética de muerte celular por acción de la toxina <i>killer</i> .	66
3.23.- Determinación de la integridad de la membrana celular por citometría de flujo.	66
3.24.- Determinación del pH intracelular.	67
3.25.- Determinación de K ⁺ y Na ⁺ por fotometría de llama.	68
3.25.1.- Determinación de K ⁺ extracelular.	69
3.25.2.- Determinación de K ⁺ intracelular.	69
3.25.3.- Determinación de Na ⁺ intracelular.	69
3.26.- Determinación del contenido en DNA por citometría de flujo.	70
3.27.- Ubicación de la información genética que codifica la toxina <i>killer</i> .	70
Experiencias de curación del carácter <i>killer</i> .	70
3.27.1.- Curación del factor <i>killer</i> .	70
3.27.2.- Extracción de DNA y RNA.	71
3.27.2.1.- Electroforesis de ácidos nucleicos.	71
IV.- RESULTADOS	73
4.1.- Determinación de la actividad <i>killer</i> .	73
4.2.- Cinética de la producción de toxina <i>killer</i> .	73
4.3.- Estudio sobre la mejora de la producción de toxina <i>killer</i> .	75
4.3.1.- Determinación de la producción de toxina en distintos medios de cultivo.	75
4.3.2.- Mejora de la producción en el medio <i>Yeast Nitrogen Base</i> .	75
4.4.- Propiedades de actividad y estabilidad de la toxina <i>killer</i> .	82
4.4.1.- Temperatura óptima de actividad.	82
4.4.2.- Estabilidad de la toxina a la temperatura.	82
4.4.3.- pH óptimo de actividad.	82
4.4.4.- Estabilidad de la toxina al pH.	82

4.5.- Efecto del NaCl y KCl en la actividad de la toxina <i>killer</i> .	85
4.6.- Estabilidad al pH y a la temperatura en presencia de NaCl.	85
4.6.1.- Estabilidad a la temperatura en presencia de NaCl.	85
4.6.2.- Estabilidad al pH en presencia de NaCl.	85
4.7.- Naturaleza de la actividad <i>killer</i> de <i>P. membranifaciens</i> .	88
4.8.- Purificación de la actividad <i>killer</i> de <i>P. membranifaciens</i> .	88
4.8.1.- Selección del material de partida.	89
4.8.2.- Concentración por ultrafiltración tangencial.	89
4.8.3.- Precipitación fraccionada con etanol.	90
4.8.4.- Isoelectroenfoque preparativo en Ultradex.	90
4.8.5.- Cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-epoxi	
-β-D-(1→6)-glucano.	90
4.8.6.- Electroforesis de la toxina <i>killer</i> purificada.	92
4.8.7.- Tabla de purificación.	92
4.9.- Determinación del punto isoelectrico.	94
4.10.- Determinación del caracter glicoprotéico.	94
4.11.- Caracterización del receptor de pared celular.	95
4.11.1.- Obtención de paredes de <i>C. boidinii</i> .	95
4.11.2.- Fraccionamiento de las paredes celulares de <i>C. boidinii</i> .	95
4.11.2.1.- Fraccionamiento para la obtención de glucanos.	95
4.11.2.2.- Obtención de manoproteínas.	95
4.11.2.3.- Obtención de quitina.	96
4.11.3.- Adsorción de la toxina a las fracciones de la pared de	
<i>C. boidinii</i> .	96
4.11.4.- Especificidad de la capacidad de adsorción de la fracción	
P-1 de pared.	97
4.11.5.- Especificidad de la unión de la toxina a polisacáridos.	98
4.11.6.- Capacidad de adsorción de los glucanos tratados con NaIO ₄ .	99
4.11.7.- Análisis químico de las fracciones P1 y P2.	100
4.11.7.1.- Hidrólisis ácida de las fracciones y análisis	
por cromatografía de gases (GLC).	100
4.11.8.- Análisis estructural de las fracciones P-1 y P-2 de la	
pared de <i>C. boidinii</i> .	102
4.11.8.1.- Oxidación con periodato sódico.	102
4.11.8.2.- Espectrofotometría de infrarrojos (IR).	102
4.11.8.3.- Resonancia magnética nuclear (¹ H-RMN).	103
4.12.- Acción de la toxina sobre los protoplastos de <i>C. boidinii</i> .	106
4.13.- Efectos de la toxina <i>killer</i> sobre las células sensibles de <i>C.</i>	
<i>boidinii</i> .	106
4.13.1.- Cinética de muerte celular por acción de la toxina <i>killer</i> .	106
4.13.2.- Acción de la toxina sobre la integridad de la membrana	
plasmática.	107
4.13.3.- Efecto en la concentración celular de K ⁺ y Na ⁺ .	109
4.13.4.- Acción de la toxina sobre el pH intracelular.	111
4.13.5.- Acción de la toxina sobre el ciclo celular.	112
4.14.- Curación (eliminación) del carácter <i>killer</i> .	115
V.- DISCUSION	116
5.1.- Introducción.	116

5.2.- Cinética de la producción y optimización de la producción de toxina <i>killer</i> .	117
5.3.- Naturaleza y características físico-químicas de la toxina <i>killer</i> .	120
5.4.- Proceso de purificación de la toxina <i>killer</i> de <i>P.</i> <i>membranifaciens</i> .	125
5.5.- Localización celular de la información genética para el factor <i>killer</i> .	128
5.6.- Caracterización del receptor de pared en <i>C. boidinii</i> para la toxina <i>killer</i> de <i>P. membranifaciens</i> .	129
5.7.- Efectos de la toxina <i>killer</i> de <i>P. membranifaciens</i> sobre las células sensibles.	134
VI.- CONCLUSIONES	141
VII.- BIBLIOGRAFIA	143

I.-INTRODUCCION

1.1.- Las levaduras *killer*.

El fenómeno *killer* fue descrito por primera vez por Makower & Bevan en 1963, describiendo ciertas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podían clasificarse dentro de tres fenotipos diferentes denominados "*killer*", "sensible" y "neutro". Las cepas "*killer*" serían capaces de matar a ciertas cepas de levaduras que se denominarían "sensibles". Las levaduras de fenotipo "neutro" se mostraban indiferentes tanto a la acción de las levaduras *killer* como a la propia posesión de dicho carácter. Actualmente, estudios más detallados han conducido a la determinación de otros fenotipos (Tabla 1.1).

Fenotipos	Descripción
K ⁺ R ⁺	Fenotipo <i>killer</i> , secreción de toxina (K ⁺) e inmunidad a ella (R ⁺).
K ⁻ R ⁺	Fenotipo neutro, no producen toxina pero producen un componente de inmunidad activo.
K ⁻ R ⁻	Fenotipo sensible, no producen toxina ni producen componente de inmunidad.
K ⁺ R ⁻	Fenotipo suicida, producen toxina activa pero no son del todo inmunes a la misma.
K ⁺⁺ R ⁺	Fenotipo <i>superkiller</i> , producen más cantidad de toxina por un aumento en el número de copias de M-dcRNA o producen toxinas más activas.
K ₂ ⁺ R ₂ ⁺	Fenotipo <i>killer</i> , hace referencia a la producción de toxina <i>killer</i> por cepas del tipo K2 que poseen una toxina y una inmunidad diferentes.

Tabla 1.1.- Fenotipos *killer* y descripción de los mismos (Bussey, 1981).

Se ha podido observar que el fenotipo *killer* es debido a la existencia de una toxina extracelular, sensible al calor y a la acción de diferentes proteasas, y es razonablemente activa a pH ácidos (Woods & Bevan, 1968). La inmunidad y producción de esta toxina está correlacionada con la presencia de elementos extracromosómicos que han sido identificados como virus con RNA de doble cadena (Somers & Bevan, 1969; Bevan *et al.*, 1973; Vodkin & Fink, 1974a; Herring & Bevan, 1974; Herring & Bevan, 1977). Estudios posteriores han conducido al descubrimiento de otras muchas levaduras con carácter *killer*, muchas de ellas con propiedades similares a la descrita por primera vez.

1.2.- Clasificación de las levaduras *killer*.

Debido a que el carácter *killer* de una levadura es resultado de la síntesis y la secreción de una toxina *killer*, la clasificación de las levaduras *killer* se ha realizado determinando la actividad de la toxinas producidas, puesto que levaduras con idéntico carácter *killer* debieran sintetizar toxinas *killer* idénticas.

Se han realizado diferentes tipos de abordajes para una clasificación adecuada:

- Determinación del espectro de actividad frente a levaduras sensibles (Stumm *et al.*, 1977; Gunge *et al.*, 1981).
- Determinación del espectro de actividad frente a mutantes resistentes a ciertas toxinas (Rogers & Bevan, 1978).
- Caracterización bioquímica de las toxinas producidas.
- Estudio de la resistencia/sensibilidad entre cepas productoras de toxinas *killer* (Young & Yagiu, 1978).

Este último ya se ha utilizado con éxito para la clasificación de las diferentes cepas *killer* de *Ustilago maydis* (Puhalla, 1968; Koltin & Day, 1985) y parece ser el método más simple y efectivo de clasificación. Por ello, las levaduras *killer* se ha clasificado atendiendo fundamentalmente a la interacción entre diferentes cepas poseedoras de dicho carácter, aprovechando que, por lógica, una cepa de levadura con un determinado tipo de carácter *killer* es resistente a la acción del mismo. Si dicha cepa es sensible al carácter *killer* de otra levadura, las toxinas producidas por ambas serán de naturaleza bioquímica diferente y, por tanto, las levaduras productoras pertenecerán a un grupo distinto en la clasificación realizada.

Este método proporciona dos criterios de valor en la clasificación. Primero, el espectro de actividad *killer* frente a otras cepas *killer* permite asignar determinadas cepas a un "grupo *killer*", y segundo, el espectro de resistencia frente a la actividad de otras cepas *killer* determinará el "grupo de resistencia" al cual pertenecen. Por ejemplo, según Naumov & Naumova en 1973, la cepa *killer* M437 aislada de vino es sensible frente a una levadura *killer*

perteneciente a la Oxford Collection y, a su vez, la cepa M437 es *killer* frente a la cepa de Oxford. Wickner (1976) propone determinar a la cepa de Oxford como K1R1 (K1= tipo *killer* K1, R1= resistente a la toxina K1) y a la cepa M437, K2R2 (K2= tipo *killer* K2, R2= resistente a la toxina K2). Posteriormente se han realizado algunas modificaciones en este sistema; Wickner (1979) propone que cuando cepas de un mismo grupo *killer* muestren patrones de resistencia distintos, su grupo de resistencia se debe nombrar con el mismo número del grupo *killer* al cual pertenecen pero subdividido (ej.: K₁R_{1a}, K₁R_{1b}, K₁R_{1c}). Por otro lado, cepas de diferente grupo *killer* con igual espectro de resistencia, tomarán como nombre de grupo de resistencia el mismo número que tienen de grupo *killer* (ej.: NCYC 16 y 435 tienen el mismo espectro de resistencia pero debido a que tienen un espectro *killer* diferente se las nombra como K₅R₅ y K₈R₈).

De este modo se han realizado clasificaciones como las de Young & Yagiu (1978) y Wickner (1979), que están recogidas por Young, (1987) (Tabla 1.2).

Debido al descubrimiento de nuevas cepas de levaduras que presentan carácter *killer* (*Williopsis mrakii*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, etc) dicha clasificación ha quedado incompleta por lo que debe ser revisada. Por otro lado, la clasificación sistemática de las levaduras está siendo revisada continuamente y sometida a grandes cambios, por lo que cepas agrupadas en un género podrían pasar a formar parte de otro diferente, lo que cambiaría también la clasificación de las levaduras *killer*. Por ejemplo, estudiando la relación existente entre los géneros *Hansenula* y *Pichia* a través de la comparación de sus ADN se ha llegado a la conclusión de que ambos pudieran ser sinónimos (Kurtzman, 1984).

CEPAS	Young & Yagiu (1978)	Wickner (1979)
<i>Saccharomyces uvarum</i> NCYC 190	K ₁ R _a	K ₁ R _{1a}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 235, 263	K ₁ R _b	K ₁ R _{1b}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> A8209B, NCYC 232, 631	K ₁ R _c	K ₁ R _{1c}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M437, NCYC 738, 1001	K ₂ R _d	K ₂ R ₂
<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 713	K ₂ R _d	K ₂ R ₂
<i>Saccharomyces capensis</i> NCYC 761	K ₃ R _e	K ₃ R ₃
<i>Torulopsis glabrata</i> NCYC 388	K ₄ R _e	K ₄ R ₄
<i>Debaryomyces vanriji</i> NCYC 577	K ₅ R _j	K ₅ R _{5b}
<i>Hansenula anomala</i> NCYC 434	K ₅ R _b	K ₅ R _{5a}
<i>Hansenula subpelliculosa</i> NCYC 16	K ₅ R _b	K ₅ R _{5a}
<i>Kluyveromyces fragilis</i> NCYC 587	K ₆ R _f	K ₆ R ₆
<i>Candida valida</i> NCYC327	K ₇ R _j	K ₇ R ₇
<i>Pichia membranifaciens</i> NCYC 333	K ₇ R _j	K ₇ R ₇
<i>Hansenula anomala</i> NCYC 435	K ₈ R _b	K ₈ R ₈
<i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500	K ₉ R _j	K ₉ R ₉
<i>Kluyveromyces drosophilae</i> NCYC 577	K ₁₀ R _j	K ₁₀ R ₁₀
<i>Torulopsis glabrata</i> ATCC 15126	K ₁₁ ?	K ₁₁ R ₁₁

Tabla 1.2.- Clasificación de levaduras *killer* atendiendo a su fenotipo de actividad y resistencia *killer*.
 NCYC: National Collection of Yeast Cultures, ATCC: American Type Culture Collection. Cepa A8209B: donada por Fink, G.R. Cepa M437: (Naumov & Naumova, 1973).

1.3.- Incidencia de las levaduras killer.

Las levaduras *killer* están extendidas entre los diferentes géneros de levaduras como *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* (*Hansenula*), *Williopsis*, *Hanseniospora*, *Sporidiobolus* y *Cryptococcus* (Woods *et al.*, 1974; Bussey & Skipper, 1976; Stumm *et al.*, 1977; Pfeiffer & Radler, 1979; Radler *et al.*, 1985; Rosini, 1985; Cansado *et al.*, 1991; Janderová *et al.*, 1995; Antuch *et al.*, 1996), y se pone de manifiesto en un amplio rango de ambientes incluyendo algunas fermentaciones industriales (vino, sake, aceitunas, etc) (Philliskirk & Young, 1975; Naumov & Naumova, 1973; van Vuuren & Jacobs, 1992; Marquina *et al.*, 1992; Marquina *et al.*, 1997). También, el fenómeno *killer* está ampliamente

distribuido entre las levaduras de laboratorio incluidas en colecciones (Young & Yagiu, 1978).

Sin embargo, pese a ser una característica extendida entre los géneros de levaduras, la incidencia de levaduras *killer* varía significativamente, incluso en ambientes similares. Cuinier & Gros (1983), estudiando las regiones vitivinícolas de Francia, encuentran que en procesos de fermentación espontánea la presencia de levaduras *killer* al final de la fermentación alcohólica varía entre el 0 y el 100%. Las muestras de la región de Touraine no contenían levaduras *killer*, mientras que en las muestras de las regiones de Gard y Beaujolais sólo se encontraron cepas *killer* (Cuinier & Gros, 1983).

La frecuencia de levaduras *killer* aisladas de ambientes naturales es muy superior al número detectado en las colecciones de levaduras. En ambientes naturales (frutas, hongos, plantas, flores, suelos...) las levaduras *killer* aisladas representan aproximadamente un 17% del total, este porcentaje disminuye al 7% en las cepas de colección (Philliskirk & Young, 1975; Starmer *et al.*, 1987a, 1987b; Rosini, 1983). La explicación a este hecho puede ser la ventaja competitiva frente a las cepas sensibles que ofrece el carácter *killer* en el ambiente.

De forma similar, un gran número de aislamientos contaminantes en ciertas industrias son levaduras poseedoras de carácter *killer*. Nuevamente, esto podría reflejar la ventaja competitiva que existe sobre las levaduras comerciales, muchas de las cuales son sensibles a la acción de las toxinas (Philliskirk & Young, 1975). A este respecto, ha sido demostrado cómo las levaduras *killer* son capaces, en el proceso de obtención de cerveza, de competir eficazmente con la levadura inoculada. En cultivos en continuo, esta competencia es mayor que en cultivos en *batch*. En estos últimos la competencia es eficaz si la presencia de levadura *killer* contaminante es muy elevada, si no es así, el gran inóculo de levadura cervecera empleado habitualmente compite por los nutrientes restringiendo el crecimiento de la cepa *killer*.

En otros procesos industriales, como la fermentación espontánea que se produce en salmueras de aceitunas verdes, la aparición de levaduras *killer* parece tener más importancia que en otros. Marquina *et al* (1992) en un estudio realizado sobre la caracterización de la flora

levaduriforme de estas salmueras detectan que el 50% de los aislamientos realizados son *killer*, siendo cepas de las especies *Pichia membranifaciens* y *P. anomala* las más abundantes. En este estudio se pone de manifiesto que las condiciones de determinación de la actividad *killer* (salinidad, pH) influyen significativamente en el número de cepas *killer* detectadas; por lo que, probablemente en muchos otros estudios exista subestimación del número de estas (Marquina *et al.*, 1992; Llorente, 1997). En otro estudio similar (Marquina *et al.*, 1997), esta vez realizado en salmueras de aceitunas marroquíes, se llega a conclusiones parecidas. El número de aislamientos *killer* detectados varió ostensiblemente en ausencia y presencia de 6% (p/v) NaCl, 12% y 46.5%, respectivamente; siendo *P. membranifaciens* la cepa con un espectro *killer* más amplio (un 59% de las cepas ensayadas fueron sensibles a su actividad). Con estos dos estudios se llega a la conclusión de que en estos ambientes salinos moderados, a diferencia de otras fermentaciones, la incidencia de las levaduras *killer* es mayor.

1.4.- El sistema *killer* de *Saccharomyces cerevisiae*.

El fenómeno *killer* de *S. cerevisiae* está asociado con unas partículas intracelulares similares a virus, denominadas VLPs (*Virus-Like Particles*), partículas que contienen un genoma de RNAdc (Bevan & Mitchell, 1969; Buck *et al.*, 1973; Herring & Bevan, 1974; Mitchell *et al.*, 1976; Pietras & Bruenn, 1976; Toh-e & Wickner, 1979). Partículas que por otro lado están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en animales, plantas, insectos, hongos y bacterias.

En *S. cerevisiae* se conocen diferentes tipos de toxinas *killer* producidas por diferentes cepas. Basándose en el tamaño de los RNAdc que presentan, estas cepas han sido clasificadas en diferentes grupos "*killer*". Young & Yagiu (1978) clasificaron las cepas de *Saccharomyces* en tres grupos (K1, K2 y K3), más tarde, Wingfield *et al.*, (1989 y 1990), han mostrado que los tipos K2 y K3 son sinónimos, apareciendo K3 por mutación de K2. Sin embargo, existen otras dos cepas *killer* más de *S. cerevisiae*, la cepa K3GR1 y la cepa KT28 (Extremera *et al.*, 1982; Pfeiffer & Radler, 1984). Estas dos últimas sí parecen ser diferentes de las conocidas K1 y K2. De las cepas de *S. cerevisiae* que presentan carácter *killer* las más estudiadas son el tipo K1 y K2, por ello, en este apartado nos hemos centrado

fundamentalmente en ellas.

Las cepas *killer* de *S. cerevisiae* pertenecientes al tipo 1 (K1) contienen dos tipos principales de RNAdc, denominadas L₁-RNAdc y M₁-RNAdc. Estas especies están encapsidadas en dos VLPs isométricas (diámetro de 38 - 40 nm), denominados ScV-L₁ y ScV-M₁, respectivamente. El L₁-RNAdc dentro de la ScV-L₁ codifica las proteínas de la cápside de ambas partículas (Bostian *et al.*, 1980). El genoma M (M₁-RNAdc) de la ScV-M₁ contiene el gen que codifica para la preprotoxina que contiene, a su vez, las funciones de inmunidad y la toxina *killer* propiamente dicha (Bostian *et al.*, 1984; Brizzard & Kloet, 1981).

El número de partículas VLPs que contiene una célula de levadura varía de 12 M y 100 L en algunas cepas *killer* (Wickner, 1976), a 24000 copias de L en la cepa S7. (Oliver *et al.*, 1977). La base de esta variabilidad tan amplia no es conocida todavía.

La transmisión de los virus en levaduras sólo ocurre por procesos que impliquen mezcla de citoplasmas como conjugación, citoducción, fusión de protoplastos, etc. Las partículas VLPs no muestran capacidad infectiva o ciclo lítico, por ello, se ha acuñado para ellas el término de "micovirus latentes".

Sin embargo, en 1987 El-Sherbeini & Bostian demostraron que los virus tipo 1 (K1) y tipo 2 (K2) son capaces de transmitirse extracelularmente durante el proceso natural de la conjugación y en procesos o circunstancias como, por ejemplo, la desaparición de la pared celular (El-Sherbeini & Bostian, 1987).

1.4.1.- RNAs de doble cadena (RNAdc) en *S. cerevisiae*.

El sistema *killer* de *S. cerevisiae* comprende, al menos, siete especies de RNAdc, llamados M, L_A, L_{BC}, S3, T, W y XL (Tabla 1.3), (Bevan *et al.*, 1973; Sommer & Wickner, 1982; Tipper & Bostian, 1984; van Vuuren & Jacobs, 1992). De todos ellos, L_A, L_{BC} y M se encuentran en el interior de partículas VLPs (Herring & Bevan, 1974; Sommer & Wickner, 1984; Wickner, 1986).

RNA _{dc} s	Descripción
M₁	RNA _{dc} de 1.8 kb. Codifica la preprotoxina K1, responsable de la inmunidad a la toxina K1 y de la secreción de la toxina <i>killer</i> K1.
M₂	RNA _{dc} de 1.5 kb que codifica para una toxina capaz de matar a las células con M-o y M ₁ .
M₃ y M₄	RNA _{dc} de 1.5 y 2.0-2.1 kb, respectivamente. Presente en K3.
L_A	RNA _{dc} de 4.5 kb que codifica para una proteína de 81 kd de la cápside de las VLPs.
L_B y L_C	Son RNA _{dc} con tamaño de 4.5 kb pero no relacionados con L _A ; L _B y L _C muestran cierta homología de secuencia. L _B y L _A o L _C y L _A son compatibles.
T y W	RNA _{dc} de 2.76 kb y 2.25 kb. No hibridan entre sí, ni con otros RNA _{dc} , ni con el DNA celular. Su número de copias aumenta 10 veces a 37°C.
S3	Es un RNA _{dc} derivado de M ₁ por delección interna de este (0.73 kb).
XL	RNA _{dc} minoritario algo mayor que L _{1A} que se observa ocasionalmente en las cepas <i>killer</i> K1.

Tabla 1.3.- RNAs de doble cadena en las cepas *killer* de *S. cerevisiae*.

1.4.1.1.- L_A-RNA_{dc}.

Todos los sistemas *killer* de *S. cerevisiae* contienen al menos una especie de L-RNA_{dc} así como un M-RNA_{dc}, determinante de la toxina *killer*. Casi todas las cepas de *S. cerevisiae*, *killer* o no, contienen una forma de ScV-L, siendo la mayoría sensibles y careciendo de M-RNA_{dc}.

Los moléculas de L-RNA_{dc} son lineales al microscopio electrónico estando constituidas por dos hebras del mismo tamaño. Existe un amplio espectro de fenotipos L_A. Las variantes encontradas en aislamientos naturales del tipo K1 muestran solamente una homología parcial con los de las cepas de tipo K2 y codifican proteínas de la cápside diferentes (Tipper & Bostian, 1984). Los dos tipos de L_A existentes se denominan L_{1A} y L_{2A} para K1 y K2, respectivamente.

1.4.1.2.- L_B-RNAdc y L_C-RNAdc.

Muchas cepas de *Saccharomyces*, *killer* o no, llevan especies de RNAdc del mismo tamaño que L_A, pero sin homología aparente con éste (Sommer & Wickner, 1984). Estas especies son designadas como L_{BC}, comprendiendo L_B y L_C-RNAdc, que se encuentran en las cepas *killer* K1 y K2. L_A y L_B se encuentran en el interior de partículas VLPs. Estas tienen actividad RNA polimerasa y producen transcritos de RNAsc que codifican para las proteínas virales de la cápside.

1.4.1.3.- M-RNAdc.

Además de los L-RNAdc, las cepas *killer* tienen unas pequeñas especies de RNAdc encapsidado denominadas M-RNAdc. Cada especie de M-RNAdc contiene el gen para la preprotoxina que codifica la toxina y las funciones de inmunidad en las cepas de *S. cerevisiae* (Bostian, 1980; Heard & Fleet, 1987). Existen varios tipos de M-RNAdc; M₁ para las cepas K1, M₂ para las cepas K2, M₃ para las K3 y M₄ que es típico de las cepas K3 del vino (Tipper & Bostian, 1984; Sulo & Michalcáková, 1992).

Las toxinas K1 y K2 están, por tanto, codificadas por los M₁ y M₂-RNAdc respectivamente (Bostian *et al.*, 1980). El tamaño de los M-RNAdc difiere en los diferentes tipos de cepas *killer*. Así, M₁ (K1) tiene un tamaño de 1.83 kb, M₂ (K2) tiene un tamaño de 1.4 kb, M₃ (1.5 kb) y M₄ (2.0-2.1 kb) (Young, 1987; Sulo & Michalcáková, 1992). Estos tamaños pueden variar en 300 pb sin afectar esto al número de copias, a la producción de la toxina, o a la inmunidad (Sommer & Wickner, 1982).

1.4.2.- Expresión, secreción e inmunidad.

Las cepas *killer* del tipo K1 son capaces de secretar una toxina a la cual ellas son inmunes. Tanto actividad como inmunidad han sido claramente relacionados con la expresión del M-RNAdc (Zhu *et al.*, 1987). Los componentes α y β de la toxina están comprendidos entre los residuos 45-147 y 234-316, respectivamente, de los 316 residuos, que en total,

forman la preprotoxina. Entre ellos, existe una región denominada γ de un tamaño total de 86 residuos, región que posee los únicos tres sitios susceptibles de N-glicosilación en la preprotoxina. Los residuos 1-44 forman la región δ , en la que se incluye el péptido señal (de 26 residuos). Una vez sintetizada la preprotoxina el fragmento "pre" (péptido señal) es escindido en el retículo endoplásmico (Zhu *et al.*, 1993). Posteriormente, el procesamiento de la protoxina ocurre en las vesículas del aparato de Golgi donde ciertas proteasas (Kex2 y Kex1) escinden la protoxina en sus componentes (α , β y γ). Los mutantes *kex2* secretan niveles muy bajos de toxina, pero permanecen inmunes a la misma, implicando esto que la protoxina completa puede servir como determinante de la inmunidad. El precursor de la toxina (protoxina) sería capaz de saturar todos los receptores existentes en la propia membrana plasmática de la célula *killer*, receptores que normalmente mediarían la acción de la toxina en las células sensibles, de modo que compitiera de forma efectiva con la toxina madura, impidiéndose la acción de esta sobre la propia célula productora (Bussey *et al.*, 1983; Wickner & Leibowitz, 1976; Boone *et al.*, 1986; Bussey *et al.*, 1988).

El análisis de la secuencia de las dos subunidades (α , β) que conforman la toxina K1 ha sugerido que el modelo para la acción de dicha toxina es similar al propuesto para la ricina, con dos subunidades unidas por puentes disulfuro, una con acción propiamente tóxica y otra con una función de unión al receptor. La región α presenta dos regiones altamente hidrofóbicas (72-91 y 112-130), separadas por una región fuertemente cargada (Bostian *et al.*, 1984). Así, esta región ha sido propuesta como la responsable de la interacción con la membrana plasmática y de la formación de canales. La región β es esencialmente una región hidrofílica y se ha postulado que es una región que interviene en la unión al receptor de pared (glucanos β -D-(1 \rightarrow 6)). El análisis por mutagénesis de las regiones ha revelado además, que la región α también interviene, junto con β , en la adsorción a los glucanos de pared y además tiene un importante papel en la inmunidad. Sobre la región γ se desconoce en gran medida su función, aunque se piensa que debe tener alguna función relacionada con la inmunidad y la expresión de la toxina (Zhu *et al.*, 1993) (Figuras 1.1 y 1.2).

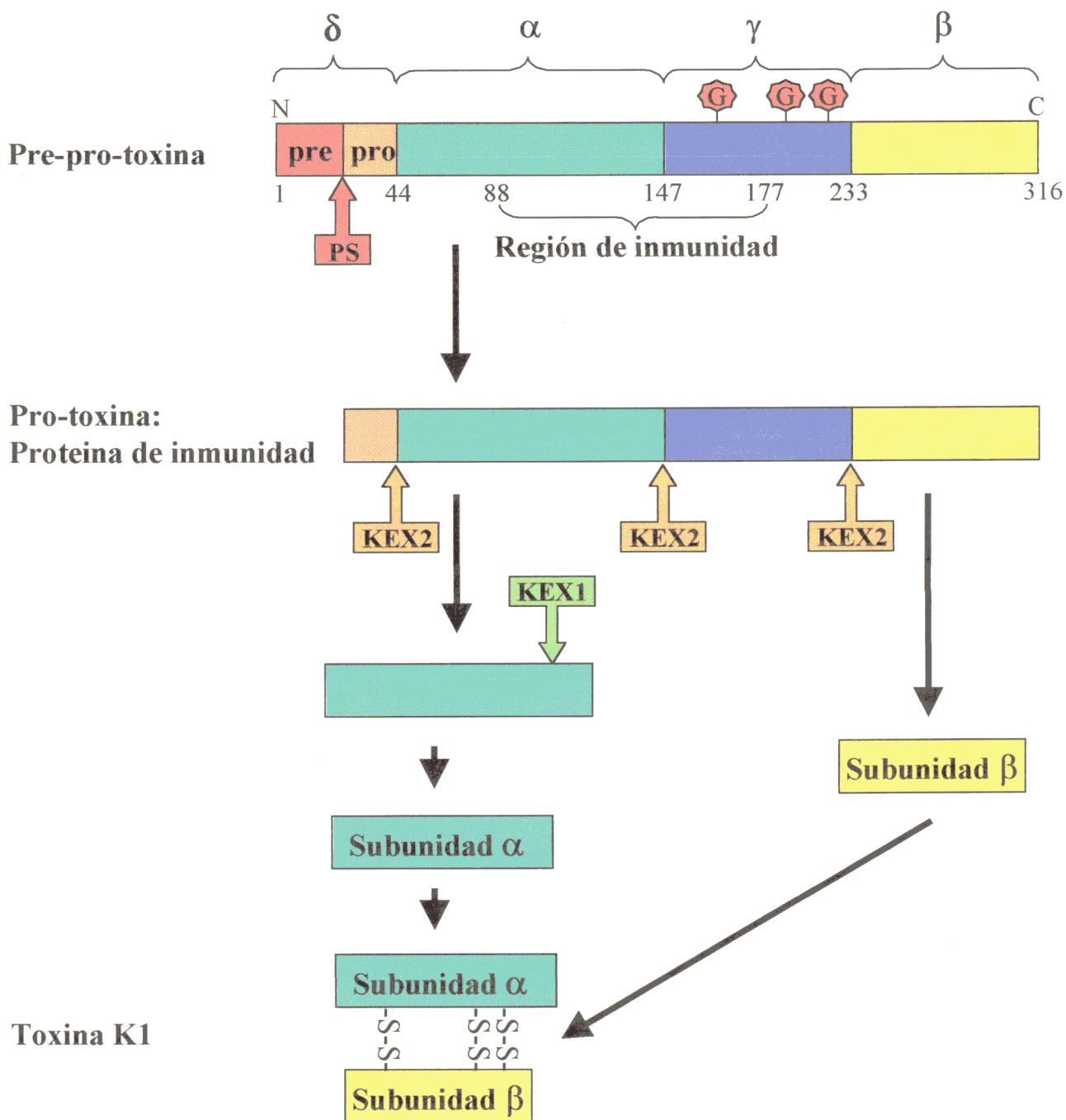


Figura 1.1.- Procesamiento de la toxina K1 de *S. cerevisiae*. PS: peptidasa del péptido señal. KEX: (*Killer Expression*) proteasas implicadas en el procesamiento de la toxina *killer*. G: glicosilación (Bussey, H. 1991; Wickner, B. 1991).

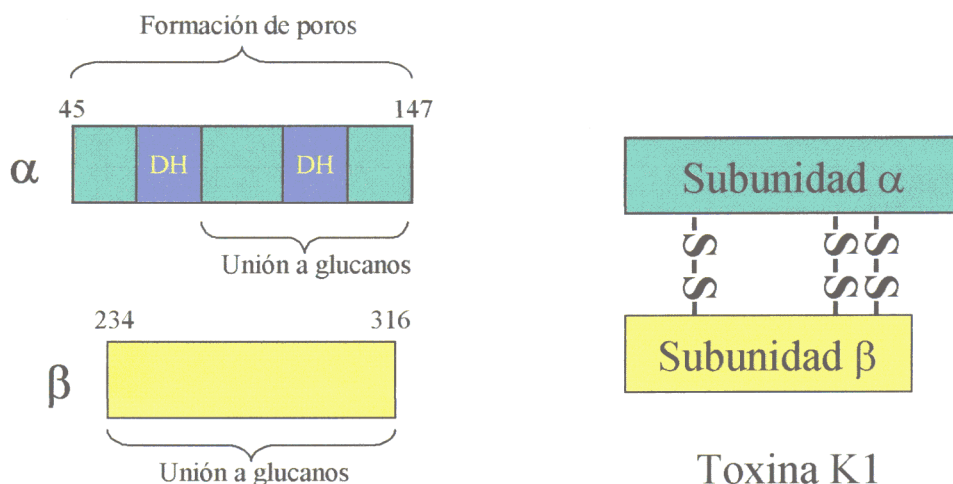


Figura 1.2.- Estructura esquemática de la toxina K1 de *S. cerevisiae* y dominios existentes en la misma. DH: Dominios Hidrofóbicos.

1.4.3.- El modelo de acción de las toxinas *killer*.

1.4.3.1.- La pared como receptor primario de las toxinas *killer*. Composición general de la pared celular en levaduras.

La pared celular de las levaduras es una estructura rígida que envuelve la célula y tiene por ello una función primaria que es la protección del protoplasma que rodea. Sin esta el protoplasma, en las condiciones osmóticas normales del medio que lo rodea, lisaría con facilidad. Aparte de este papel como esqueleto, la pared tiene otras funciones no tan obvias. La pared confiere la forma a la célula gracias a la organización de las macromoléculas que la componen, estando dicha forma bajo un control genético. Además, existen un gran número de actividades enzimáticas asociadas a la pared o al espacio periplásmico que queda entre membrana plasmática y la pared celular. Algunas de estas enzimas tienen como función hidrolizar nutrientes extracelulares mientras que otras están involucradas en una hidrólisis controlada de algunas macromoléculas de la pared durante procesos morfogénicos celulares (Fleet, 1991). Dichas enzimas también pudieran tener la función de movilizar ciertos materiales de la pared para su reutilización posterior en el metabolismo. Asimismo, otra función asociada a la pared son los procesos de agregación celular como floculación y

conjugación en los que están involucradas ciertas macromoléculas de la pared que actúan como receptores más o menos específicos para ciertas moléculas como las hormonas (feromonas) presentes en la conjugación o para las toxinas *killer* producidas por otras levaduras (Bussey *et al.*, 1973; Bussey *et al.*, 1979; Al-Aidroos & Bussey, 1978; Hutchins & Bussey, 1983; Schmitt & Radler, 1987; Young, T.W. 1987; Schmitt & Radler, 1988).

La pared celular de una levadura es, de forma general, el 15-25% del peso seco de la misma. Los polisacáridos presentes (glucanos, mananos y quitina) representan del 80 al 90% de dicha pared. En mucha menor proporción la pared también está formada por proteínas y lípidos. De los polisacáridos que forman la pared, glucanos y mananos son los más importantes, ya que la quitina, salvo en pocas excepciones, es un componente muy minoritario en levaduras.

1.3.3.2.- Composición química de la pared de las levaduras.

Glucanos. La hidrólisis ácida de las paredes celulares aisladas de una levadura rinde siempre una elevada proporción de glucosa, indicando este hecho la existencia de una elevada proporción de glucanos en la pared de la misma, entre un 30 y un 60% en *Saccharomyces cerevisiae* y de un 25 a un 50% en *Candida utilis*. La proporción de glucanos es diferente dependiendo del estudio ya que el contenido varía con las condiciones de cultivo (fase de crecimiento, nutrientes, etc) y con el protocolo empleado en su extracción. La utilización de tampones con pH elevados (en torno a pH 8.5) impide la actividad de las glucanasas intracelulares liberadas en la obtención de las paredes celulares, lo cual aumenta de forma significativa el rendimiento en la extracción de glucanos ya que de otro modo estos son susceptibles de degradación.

En la actualidad, además, se considera que existen varios tipos de glucanos diferentes, atendiendo a la distinta facilidad para ser solubilizados de la pared de la levadura. Glucanos β -(1 \rightarrow 3), insolubles en álcali e insolubles en ácido acético; glucanos β -(1 \rightarrow 3), solubles en álcali y glucanos β -(1 \rightarrow 6) insolubles en álcali y solubles en ácido acético.

Cada uno de los tipos de glucano descritos están presentes en la pared de la levadura en un porcentaje que varía dependiendo del proceso empleado en su extracción. Los glucanos con enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 3) son los mayoritarios, siendo estos el 50% (p/p) de la pared de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los glucanos con enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 6) son minoritarios, tan sólo un 5% (p/p) en dicha levadura (Fleet, 1991).

Manoproteínas. El manano es uno de los componentes mayoritarios de la pared de muchas levaduras, representa de un 10 a un 20% de la pared en *C. utilis* y de un 25 a un 50% en *S. cerevisiae*. Tras su extracción cuidadosa, se puede observar como los mananos en las levaduras se encuentran unidos covalentemente a proteínas, por lo que el término manoproteínas parece ser más correcto, ya que describe con mayor propiedad el estado de estas macromoléculas en la pared. Podemos encontrar cuatro tipos de manoproteínas en una levadura. En primer lugar, manoproteínas de tipo intracelular. En segundo lugar, manoproteínas estructurales formadoras en su mayor parte de la pared celular. Este segundo tipo, cuya función todavía no es clara, no parece estar involucrada en mantener la forma ni el tamaño de la levadura, papel atribuido a los glucanos, ya que al ser eliminado de la pared esta permanece sin cambios. Existen evidencias de que estas manoproteínas pueden actuar como receptores, por ejemplo, se ha determinado como las manoproteínas aisladas de las paredes de *S. cerevisiae* pueden actuar como receptores primarios para la toxina KT28 de *S. cerevisiae* (Schmitt & Radler, 1987 y 1988). El tercer tipo de manoproteínas lo componen los factores de aglutinación presentes en la superficie de algunas levaduras (*Hansenula wingei*, aunque también en *S. cerevisiae*), que actúan en los procesos de conjugación. Por último, el cuarto tipo de manoproteínas comprende diferentes tipos de actividades enzimáticas extracelulares de la levadura como invertasas y fosfatasas ácidas del espacio periplásmico (Phaff, 1963; Rogers *et al.*, 1980; Fleet, 1991).

Quitina. La quitina es un polisacárido lineal compuesto por residuos de *N*-acetilglucosamina unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4). Los niveles de quitina presentes en las levaduras son significativamente menores que en los hongos filamentosos. Existen levaduras que carecen de este componente (*Schizosaccharomyces*) y otras que presentan elevados niveles de este (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Cryptococcus*). La quitina, en su mayor parte, está

presente en la pared en las cicatrices producidas en la gemación. La cantidad de quitina presente en la pared de *Saccharomyces cerevisiae* es de un 1-2% dependiendo del grado de gemación ocurrido en las células. En *Candida albicans* el porcentaje varía mucho entre células que forman parte de un micelio (2.7-21%) y las que no (0.6-9%) (Elorza *et al.*, 1983; Sullivan *et al.*, 1983 y Kollár *et al.*, 1995). Debido a la extrema insolubilidad de la quitina, el aislamiento de la misma requiere repetidas extracciones ácidas y alcalinas para eliminar cualquier residuo de glucanos o manoproteínas. Pese a ello la quitina extraída suele estar contaminada con glucanos y es necesario realizar una extracción con ácido clorhídrico 10 M en el que la quitina es soluble y luego fácil de extraer neutralizando la solución.

Lípidos. Existen un gran número de referencias que ponen de manifiesto la existencia de lípidos en las paredes aisladas de las levaduras. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado de un 2 a un 14% de lípidos, en *Candida utilis* entre un 1 y un 15%, en *Candida albicans* entre un 0.5 y un 7%, *Schizosaccharomyces pombe* 5-10%, *Yarrowia lipolytica* 5%. Existe la duda de si el verdadero origen de estos lípidos de la pared está en la membrana plasmática y simplemente, estos puedan ser una contaminación al realizar el aislamiento de las paredes. No existe todavía una función definida que se haya atribuido a los lípidos de la pared de las levaduras (Fleet, G.H. 1991).

Proteínas. De igual modo que para los otros componentes de la pared celular las condiciones de cultivo influyen de manera importante en la cantidad de proteínas presentes en la pared. Por ello, el contenido en proteína varía mucho según los diferentes autores para una misma especie de levadura: *Saccharomyces cerevisiae* 5-15%, *Hanseniaspora uvarum* 5-10%, *Candida albicans* 5-10%, *Rhodotorula* spp. 5-10%, etc. De la misma forma que en el caso de los lípidos una extracción cuidadosa es necesaria para evitar la contaminación con proteínas del citoplasma y de la membrana plasmática (Bacon, 1981). Las funciones de estas son muy variadas, desde una función meramente estructural a las diferentes actividades enzimáticas, factores de aglutinación, etc.

1.4.3.3.- Acción de las toxinas killer sobre la pared celular.

Existe un gran número de autores que han estudiado el proceso de adsorción de distintas toxinas *killer* a las diferentes estructuras de la pared de las levaduras sensibles. (Bussey & Skipper, 1975; Pfeiffer & Radler, 1982; Schmitt & Radler, 1987; Takita & Castilho-Valavicius, 1993; Kasahara *et al.*, 1994; Kurzweilová & Sigler, 1994). La mayor parte de estos han estudiado la adsorción de las toxinas *killer* producidas por *Saccharomyces cerevisiae*. Entre ellas, se conoce el receptor de las toxinas K1, K2, K3 y KT28. Las tres primeras tienen como receptor en la pared los β -D-(1 \rightarrow 6)-glucanos, mientras la cuarta, con unas características diferentes, tiene como receptor primario a las manoproteínas de la pared (Al-Aidroos & Bussey, 1978; Bussey *et al.*, 1979; Hutchins & Bussey, 1983). Curiosamente, tanto las cepas sensibles como las *killer* poseen un gran número de estos receptores. Este proceso de unión a la pared no requiere gasto de energía y se completa entre tres minutos (a 20°C y pH 4.7) (Bussey *et al.*, 1979) y cinco minutos (Kurzweilová & Sigler, 1994). La existencia de mutaciones cromosómicas (*krel* y *kre2*) que producen una disminución en la cantidad de toxina que es capaz de unirse a la pared al disminuir el contenido en β -D-(1 \rightarrow 6)-glucanos, demuestra la existencia de estos receptores en la pared. En el caso de la toxina K1 de *S. cerevisiae* se ha podido determinar que la subunidad β es la responsable de la adsorción a la pared de la levadura, aunque una pequeña región de la subunidad α también está implicada. Sobre el papel que juega la pared en la acción de la toxina se ha postulado que la pared podría ser un lugar en el cual las moléculas de toxina pudieran acumularse para después ejercer su acción sobre la membrana plasmática.

1.4.3.4.- La membrana plasmática como receptor secundario de las toxinas *killer*.

La acción de las toxinas *killer* sobre la membrana plasmática está aun sin aclarar completamente. Aunque el receptor de la pared celular es necesario para la acción de las toxinas *killer* sobre células intactas, no parece ser el único componente implicado en el proceso (Bussey *et al.*, 1973; Zhu & Bussey, 1989; Schmitt & Compain, 1995; Martinac *et al.*, 1990). Varios hechos experimentales sugieren la existencia de un segundo receptor ubicado

en la membrana plasmática (Bussey *et al.*, 1979; Zhu & Bussey, 1989a; Bussey, 1991). Los mutantes *kre1*, *kre2* (*killer resistant*) son resistentes a la acción de varias toxinas *killer*, sin embargo, los protoplastos (células sin pared) de estos mutantes *kre* son sensibles, sugiriendo la existencia de un receptor en la membrana (Bussey *et al.*, 1973).

En estudios preliminares se demostró que las células sensibles en fase exponencial de crecimiento son más susceptibles a la acción de la toxina que las células en fase estacionaria (Woods & Bevan, 1968), haciendo esto pensar que este segundo proceso, a nivel de la membrana plasmática, es dependiente de energía (ATP) (Skipper & Bussey, 1977). Poco después de la unión a la pared las células sensibles pierden sus gradientes electroquímicos impidiendo los transportes acoplados de protones y aminoácidos (de la Peña *et al.*, 1980; de la Peña *et al.*, 1981; Gásková *et al.*, 1994). Se puede asumir de todo esto que como consecuencia de la acción de la toxina se forman poros en la membrana plasmática, a través de los cuales saldrían iones como el K^+ y metabolitos de bajo peso molecular como el ATP (Bussey & Sherman, 1973; Skipper & Bussey, 1977). Estas afirmaciones quedan respaldadas por los cambios en la permeabilidad de membranas lipídicas artificiales en presencia de toxina *killer* (Kagan, 1983). El proceso de muerte desencadenado por la acción de la toxina tiene su mayor importancia a las dos o tres horas, dependiendo de la cepa utilizada (Bussey, 1972; Skipper & Bussey, 1977). El seguimiento de los procesos metabólicos y biosintéticos que acontecen en la célula sensible, tras la adición de toxina, han mostrado que existe un periodo inicial en el cual no es posible observar ningún efecto en las células. Tras este es posible observar como la síntesis de macromoléculas se detiene (Bussey & Sherman, 1973), apareciendo a su vez daños en la membrana plasmática, con salida de K^+ y ATP (Bussey & Sherman, 1973; Skipper & Bussey, 1977). Las células con su membrana plasmática dañada disminuyen de volumen, debido a la pérdida de metabolitos de bajo peso molecular a través de los poros producidos en la membrana celular (Bussey, 1974), (Figura 1.3a). Existen, además, otras toxinas *killer* cuya actividad no está relacionada con los procesos citados anteriormente. Estas toxinas, KT28 de *S. cerevisiae* y la toxina de *Kluyveromyces lactis* intervienen en procesos relacionados con la síntesis de ADN; procesos todavía no determinados en profundidad (Figura 1.3b).

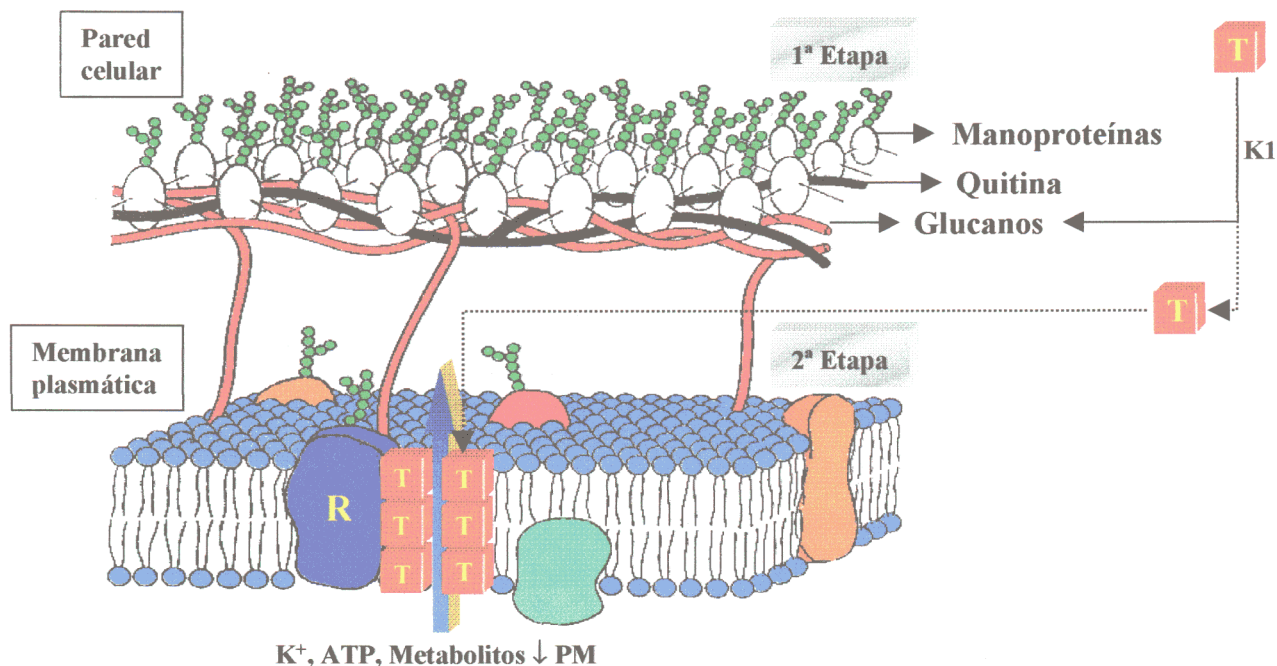


Figura 1.3a.- Modelo de actividad *killer* propuesto para la toxina K1 de *S. cerevisiae*. La acción se realiza en dos etapas: la primera a nivel de la pared de la levadura sensible y la segunda a nivel de la membrana plasmática. La acción de la toxina conduce a la salida de iones, ATP y metabolitos de bajo peso molecular (Schmitt & Compain, 1995).

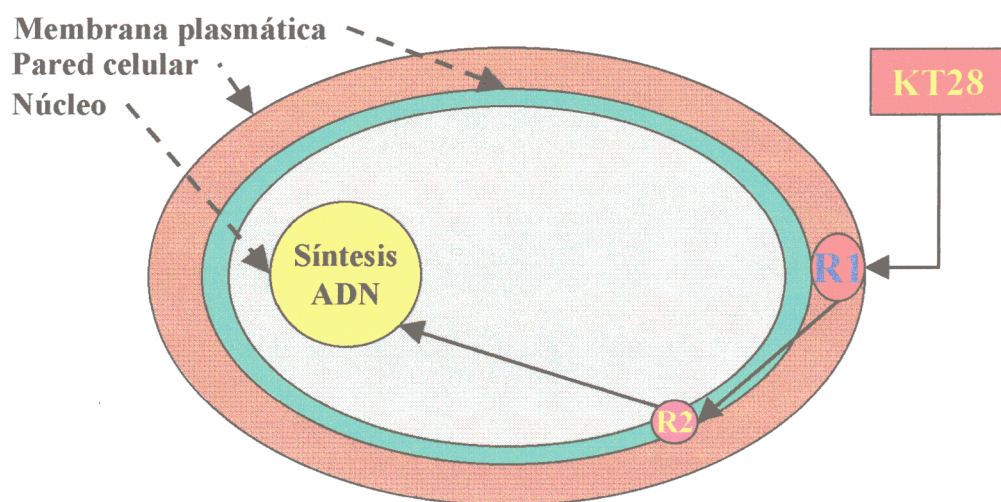
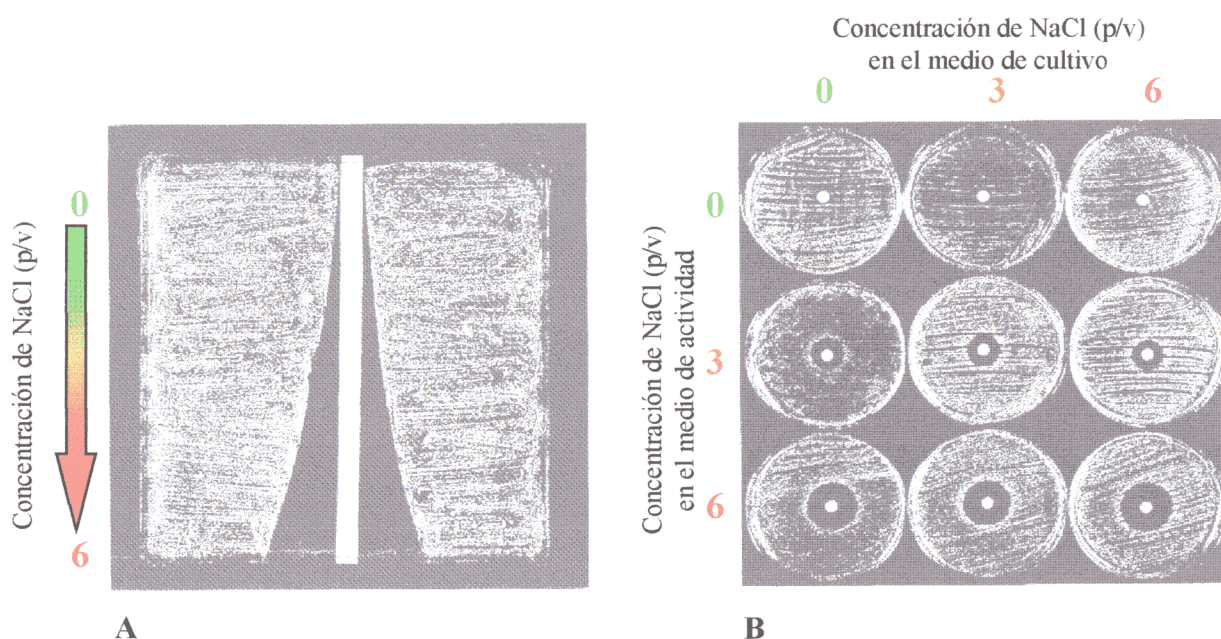


Figura 1.3b.- Mecanismo de acción de la toxina KT28 de *S. cerevisiae*. El modelo propuesto tiene dos estados; en el primero la toxina se une a la pared celular a nivel de las manoproteínas de la misma (**R1**). La toxina entonces es accesible a un receptor que estaría situado en la membrana plasmática (**R2**). La interacción con dicho receptor se postula que desencadenaría una serie de señales que conducirían a la inhibición de la síntesis de DNA (Schmitt *et al.*, 1996).

1.5.- Detección de la actividad *killer* de levaduras.

Se han descrito varios métodos para la determinación de la actividad *killer* de levaduras. El más utilizado consiste en el empleo de una o varias cepas caracterizadas como sensibles que son enfrentadas a las cepas que se quieren testar como *killer*. Se utiliza un medio sólido rico en nutrientes sobre el cual se realiza un cespel con la levadura sensible. Sobre el cespel se inocula la cepa *killer*, o se deposita en un pocillo o en un disco de papel de filtro un extracto cuya actividad se desea testar. De este modo, tras el crecimiento de la cepa sensible dos o tres días después, se observan halos de inhibición alrededor de las colonias *killer* positivas o de los extractos con dicha actividad (Woods and Bevan, 1968) (Figura 1.4).



En este ensayo resulta de utilidad suplementar el medio de cultivo con azul de metileno, ya que la presencia de este colorante vital hace posible el detectar, en torno a los halos de inhibición, una zona de color azul oscuro que pone de manifiesto la muerte de las

levaduras y no sólo la inhibición de su crecimiento. Como factores a controlar tienen gran importancia el cultivo a una temperatura y pH adecuados. Debido a que la mayoría de las toxinas *killer* son rápidamente inactivadas a temperaturas superiores a 20°C, la incubación no debe realizarse a una temperatura superior, aunque para obtener tiempos de ensayo más cortos algunas veces puede incubarse a temperaturas mayores (25-30°C) dado que las toxinas en medios ricos en proteínas y en medios sólidos se encuentran más estabilizadas, aunque, se debe tener en cuenta la pérdida de actividad ocasionada por la temperatura. Respecto al pH del medio, este debe ser ácido, pH cercano a 4.5, ya que la mayoría de las toxinas son inactivadas cuando el pH se aproxima a valores superiores a 5.0, por esta razón el medio debe estar tamponado convenientemente.

La utilización de métodos no adecuados para la detección de cepas *killer* probablemente ha conducido a pasar por alto un gran número de aislamientos con carácter *killer*, como es demostrado por Llorente *et al.* (1997), que utilizando cepas de levaduras aisladas de salmueras de aceitunas verdes portuguesas destacan como la utilización de NaCl en el medio de detección de actividad incrementa en gran medida el número y actividad *killer* de los aislamientos realizados (Figura 1.4).

La posibilidad de enfrentar en una misma placa a una cepa sensible (cesped) frente a varias cepas *killer* o supuestamente *killer* hace de este método el más conveniente para la realización de un *screening*. Del mismo modo sirve para valorar la actividad presente en extractos extracelulares.

Del mismo modo que en la utilización de antibióticos, empleando este método se ha podido observar que el logaritmo de la actividad *killer* presenta una relación lineal con el diámetro del halo de inhibición (Woods & Bevan, 1968; Ouchi *et al.*, 1978; Radler & Schmitt, 1987). Por esta razón, resulta útil realizar una recta patrón que relacione ambos parámetros, definiendo a continuación la actividad *killer* en unidades arbitrarias (UA). La concentración celular utilizada para los ensayos determina en gran medida el resultado de los mismos, por esta razón el inóculo debe estandarizarse. Se ha demostrado que los halos de inhibición producidos son inversamente proporcionales al logaritmo de la concentración celular, es decir,

cuanto mayor es la concentración de células presente en el cespel menor es el halo de inhibición (Kurzweilová & Sigler, 1995a). Concentraciones entre 10^5 y 10^6 células/ml son las más utilizadas (Young, 1987; Kurzweilová & Sigler, 1995a).

Otro método para la determinación de la actividad *killer* es el método del recuento de viables en placa. Consiste en determinar a lo largo del tiempo el número de células de la cepa sensible que permanecen viables tras el tratamiento con la toxina *killer*. No es un buen método para la realización de un *screening* debido a su laboriosidad y a que no permite enfrentar varias cepas entre si al mismo tiempo como ocurre en el método anteriormente descrito.

El desarrollo de colorantes (ioduro de propidio, púrpura de bromocresol, etc) capaces de discernir entre células vivas y muertas ha posibilitado el uso de estos para determinar la muerte celular causada por las toxinas *killer*. Algunos de estos colorantes, los más utilizados, discriminan las células vivas de las muertas simplemente debido a que son incapaces de atravesar las membranas celulares intactas de las células vivas. Sin embargo, las células muertas tienen dañadas dichas membranas y esto permite el paso del colorante al interior celular. La observación al microscopio permite el recuento de las células que van muriendo.

La comparación entre el método de recuento de viables en placa y los métodos basados en colorantes permite observar ciertas diferencias en los resultados obtenidos. Las tasas de muerte, calculadas por el método de recuento en placa, son sistemáticamente mayores a las calculadas con el uso de colorantes. Dichas diferencias se atribuyen, en su mayor parte, a la existencia de células que siendo incapaces de volver a dividirse, por los daños sufridos, permanecen con su membrana plasmática intacta y por ello impermeable a los colorantes usados (Kurzweilová & Sigler, 1993b). Por otro lado, la diferente intensidad con la que las células se tiñen hace que este método este sometido al criterio del investigador y por tanto, carente de objetividad. Por ello, la utilización de nuevas tecnologías como la citometría de flujo permite, una mayor fiabilidad, ya que es el aparato el que se encarga de la determinación cualitativa de la intensidad del color presente en el interior de la célula. Además, la citometría de flujo permite la utilización simultanea de colorantes fluorescentes con distintas propiedades lo que permite establecer de manera más precisa la muerte celular (Carter *et al.*, 1991). El

empleo de fluorocromos en la determinación de la actividad de ciertas toxinas ha sido utilizado con resultados diferentes, ya que, según la toxina empleada, los colorantes parecen ser eficaces o no. Kurzweilová & Sigler, (1993b) empleando púrpura de bromocresol llegan a la conclusión de que es un buen método a la hora de determinar la actividad de la toxina K1 de *S. cerevisiae*, otros autores (Sugisaki *et al.*, 1983; Vondrejs *et al.*, 1996) no llegan a iguales conclusiones. La toxina producida por *K. lactis* produce en las células sensibles una parada en fase G1 del ciclo celular, no mostrándose permeables a los tintes fluorescentes.

1.6.- Toxinas killer caracterizadas en levaduras.

El fenómeno *killer* está presente en un amplio número de géneros de levaduras como *Saccharomyces* (Palfree & Bussey, 1979; Pfeiffer *et al.*, 1984; Schmitt & Radler, 1987), *Candida* (Bussey & Skipper, 1975), *Debaryomyces* (Gunge *et al.*, 1993), *Kluyveromyces* (Sugisaki *et al.*, 1984; Takita & Castilho-Valavicius, 1993; Kono *et al.*, 1997), *Pichia* (*Hansenula*), *Sporidiobolus* (Janderová *et al.*, 1995), *Hanseniaspora* (Radler *et al.*, 1990), *Zygosaccharomyces* (Radler *et al.*, 1993) y *Cryptococcus* (Stumm *et al.*, 1977). Si bien las toxinas *killer*, presentan características similares en cuanto a resistencia a agentes físico-químicos (pH, temperatura), masa molecular (normalmente pequeña) y puntos isoelectrónicos (ácidos), en realidad existen actualmente un elevado número de cepas *killer* cuyas toxinas se alejan de estas características generales en uno u otro aspecto. Sirva de ejemplo la toxina de *Kluyveromyces lactis* que presenta una masa molecular mucho mayor a lo habitual (aproximadamente 180 kDa) y está formada por tres subunidades, o las toxinas del género *Hansenula* que poseen una estabilidad elevada frente a pH y temperatura.

Debido a nuestro especial interés por las toxinas producidas por especies del género *Pichia*, se dedica a este género un apartado completo; por esta razón, no se realizará mención a este en el actual apartado (Tabla 1.4).

De las características de estabilidad y actividad frente a factores como el pH y la temperatura, las toxinas descritas no difieren mucho entre sí. Los distintos métodos empleados para determinar estas características (método de detección de actividad, tiempo de incubación

en presencia de los agentes físico-químicos, etc) hacen difícil su comparación.

Cepa <i>killer</i>	Masa molecular (Da)	Subunidades (No.)	Punto isoeléctrico (pH)	Glicoproteína	Codificada en	Receptor primario
<i>K. lactis</i>	180000	3	-	-	Plásmido DNAdc	Quitina
<i>K. waltii</i>	>10000	-	-	-	-	-
<i>Sacch. cerevisiae</i> K1	20400	2	5.3	No	Plásmido RNAdc	$\beta(1\rightarrow6)$
<i>Sacch. cerevisiae</i> K2	13207	1	4.2-4.3	Si	Plásmido RNAdc	$\beta(1\rightarrow6)$
<i>Sacch. cerevisiae</i> K3	18000	1	4.0-4.4	Si	Plásmido RNAdc	$\beta(1\rightarrow6)$
<i>Sacch. cerevisiae</i> KT28	14045	1	4.4	Si	Plásmido RNAdc	Manoprot.
<i>Sporid. parvoseus</i>	-	-	-	-	Cromosoma	-
<i>H'pora. uvarum</i>	18000	1	3.7-3.9	No	Plásmido RNAdc	$\beta(1\rightarrow6)$
<i>C. krusei</i>	-	-	3.6-3.8	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Si	Cromosoma?	-
<i>Deb. hansenii</i>	-	-	-	-	Cromosoma	-
<i>Zygosacch. bailii</i>	10000	1	4.1	No	Plásmido RNAdc	Manoprot.

Tabla 1.4.- Características de las toxinas *killer* pertenecientes a diferentes géneros de levaduras. (-): Datos no encontrados o no disponibles en la bibliografía.

1.7.- Toxinas *killer* en el género *Pichia*.

El género *Pichia* es muy heterogeneo y está sometido a una reestructuración dentro del mismo (Kurtzman, 1984). Tal vez por esta razón las toxinas *killer* caracterizadas actualmente dentro de este género no presentan muchas similitudes entre sí. Existen varias toxinas estudiadas dentro del género *Pichia*: *P. kluyveri* (Middelbeek *et al.*, 1979; Middelbeek *et al.*, 1980; Zorg *et al.*, 1988; Starmer, 1992), *P. farinosa* (Suzuki *et al.*, 1989; Suzuki & Nikkuni, 1994; Suzuki *et al.*, 1997), *P. fermentans* (Pfeiffer *et al.*, 1984), *P. acaciae* (McCracken *et al.*, 1994), *P. anomala* (Sawant *et al.*, 1988; Sawant *et al.*, 1989), *P. inositovora* (Hayman, 1991), *H. saturnus* (Ohta *et al.*, 1984; Komiyama *et al.*, 1995), *H. mrakii* (Ashida *et al.*, 1983;

Kasahara *et al.*, 1994; Hodgson *et al.*, 1995). Incluimos en este apartado las toxinas del género *Hansenula* ya que este género y el género *Pichia* son sinónimos (Kurtzman, 1984) (Tabla 1.5).

Cepa <i>killer</i>	Masa molecular (Da)	Subunidades (No.)	Punto isoeléctrico (pH)	Glicoproteína	Codificada en:	Receptor primario
<i>P. acaciae</i>	187000	3	-	-	Plásmido DNAdc	-
<i>P. anomala</i>	83000	-	-	-	-	-
<i>P. farinosa</i>	14214	2	-	Si	Cromosoma	(a)
<i>P. fermentans</i>	-	-	3.8-4.2	-	-	-
<i>P. inositovora</i>	>100000	-	-	-	Plásmido DNAdc	-
<i>P. kluyveri</i>	19000	1	4.3	Si	Cromosoma	-
<i>H. mrakii</i> LKB 169	10700	1	-	No	Cromosoma	(b)
<i>H. mrakii</i> K-500	>1500 <5000	-	-	-	-	-
<i>H. saturnus</i>	9543	1	5.8	No	Cromosoma	-

Tabla 1.5.- Características de las toxinas *killer* pertenecientes al género *Pichia*. (a): Del receptor de pared para esta toxina sólo se sabe que no son los β -D-(1 \rightarrow 6)-glucanos de la pared. (b): Probablemente los glucanos de tipo β -D-(1 \rightarrow 6) sean los receptores para esta toxina, aunque los β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanos parecen tener también algún papel como receptores de pared. (-): Datos no encontrados o no disponibles en la bibliografía.

Las toxinas *killer* producidas por las levaduras del género *Pichia* no parecen tener mucha relación entre sí, excepto las toxinas de *H. mrakii* y *H. saturnus* que presentan un alto grado de homología (87%) (Komiyama *et al.*, 1995 y 1996). Las toxinas producidas por estas dos levaduras presentan también propiedades singulares entre las toxinas *killer* ya que concretamente la toxina de *H. mrakii* es muy estable a la temperatura y a los cambios de pH (es estable a 100°C durante 3 minutos y también a valores de pH comprendidos entre 2 y 11). La toxina de *H. saturnus* pese a ser algo menos estable a estos agentes presenta también una elevada estabilidad en comparación con el grueso de toxinas *killer* (permanece estable en un

75% a 80°C durante 1 hora y presenta estabilidad en un rango de pH comprendido entre 3 y 11) (Ohta *et al.*, 1984).

El resto de toxinas producidas por levaduras pertenecientes al género difieren en su resistencia a los agentes físico-químicos respecto a las dos toxinas comentadas anteriormente. La toxina de *P. kluyveri* presenta estabilidad entre valores de pH entre 2.5 y 4.7. Dicha toxina permaneció estable hasta una temperatura de 40°C durante 30 minutos. La actividad *killer* de *P. inositovora*, aun poco estudiada, presenta igualmente actividad en presencia de pH ácidos (3.4-4.2), la exposición de esta toxina a una temperatura de 65°C durante 10 min produjo una completa pérdida de actividad en la misma (Hayman, 1991). De la toxina de *P. farinosa* cabe decir que es una toxina que al igual de la toxina de *P. kluyveri* presenta sólo actividad a pH ácidos, en este caso se ha demostrado que la toxina de *P. farinosa*, que presenta dos subunidades, es sólo activa a pH ácidos debido a que en presencia de estos valores de pH las dos subunidades están fuertemente unidas (sin puentes disulfuro) separándose a valores de pH neutros, precipitando una de las subunidades en estas condiciones, lo que conduce a la pérdida de la actividad *killer* (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1997). Respecto a las otras actividades *killer* descritas en otras especies del género: *P. americana*, *P. angusta*, *P. ciferrii*, *P. dryadoides*, *P. euphorbiaphila*, *P. lynferdii*, *P. muscicola*, *P. petersonii*, *P. populi* y *P. silvicola* (Provost *et al.*, 1995) no existen datos referentes a sus características.

1.8.- Aplicaciones de las toxinas *killer*.

1.8.1.- Empleo en la industria vitivinícola y de alimentación.

Las levaduras *killer* han sido empleadas en la industria de la producción de vino. Cepas *killer*, con buenas propiedades como fermentadoras, han sido seleccionadas o construidas para la producción de saké, vino y cerveza, sin tener en cuenta el uso de la toxina *killer* como conservante en vinos embotellados (Shimizu *et al.*, 1985; Tredoux *et al.*, 1986; Gockowiak, 1986; Jacobs & van Vuuren, 1991; Petering *et al.*, 1991; Vagnoli *et al.*, 1993; Hidalgo & Flores, 1994; Javadekar *et al.*, 1995; da Silva, 1996). Ciertas levaduras *killer* son capaces de dominar el proceso de fermentación aun cuando en el inicio de esta estén en una proporción

baja respecto a la población global de levaduras. Por esta razón, estas cepas pueden ser utilizadas como *starter* en la fabricación del vino, evitando el desarrollo de cepas sensibles contaminantes (Cansado *et al.*, 1992). También del mismo modo podrían ser empleadas con alimentos que se quisieran preservar de la contaminación por levaduras no deseadas (Palpacelli *et al.*, 1991).

Un ejemplo de utilización de estas levaduras en la obtención de vino, ha sido desarrollado en Japón para evitar la aparición de algunas levaduras contaminantes formadoras de pseudo-films (Hara *et al.*, 1981). En este caso, se ha construido una levadura con las propiedades de una levadura buena fermentadora empleada en producir vino, y otra, con carácter *killer*. La cepa construida posee las mismas características fermentativas de la cepa original, siendo capaz de controlar el crecimiento de estas cepas formadoras de pseudo-film. Por citoducción, otros autores (Ouchi *et al.*, 1976; Young, 1981) han sido capaces de crear cepas de este tipo. Esta técnica, frente al retrocruzamiento empleado por Hara *et al.*, (1981), permite transferir el carácter *killer* sin peligro de transferir material genético del núcleo que pudiera aportar características no deseadas. La cepa construida por este método fue capaz de inhibir el desarrollo de levaduras sensibles y presentó características similares a las de la cepa con buena capacidad fermentadora. Otros autores, (Seki *et al.*, 1985) empleando esta técnica de citoducción han realizado la misma experiencia utilizando una cepa empleada en la producción de vino (cepa Montrachet 522). La cepa construida fue capaz de impedir el crecimiento de cepas sensibles en una fermentación mixta en mosto de uva (pH 3.5, 20°C). Esta misma experiencia se ha realizado también integrando el gen de la toxina K1 en una cepa K2 empleada en la obtención de vino. Como resultado de esta se obtuvo una cepa estable con carácter *killer* doble K1/K2 y buenas propiedades de fermentación (Boone *et al.*, 1990).

La presencia de levaduras *killer* de forma natural, tanto en la viñas como en las bodegas, es bien conocida; se ha descrito la presencia de 10^3 a 10^5 levaduras salvajes por mililitro en zumo de uva, antes de la inoculación. En teoría, muchas de esas cepas podrían ser *killer* (Jacobs *et al.*, 1988). Dichas levaduras podrían terminar por dominar una fermentación inicialmente inoculada con una cepa sensible. Esta contaminación puede generar problemas como una alta acidez, producción de H_2S , ácido láctico, acetaldehído, reducción del

rendimiento en etanol, etc; con los elevados costes que ello supone. Puesto que dichas levaduras *killer* "no controladas", en su mayoría, no son beneficiosas para el proceso de vinificación, el uso de levaduras *killer* con buenas características fermentativas parece ser el único camino para evitar fermentaciones fallidas por contaminación con levaduras *killer* perjudiciales. Dichas cepas, empleadas como cultivos *starter* podrían prevenir el crecimiento de cepas *killer* salvajes. Las levaduras *killer* más empleadas de esta forma han sido K1, K2 y las cepas *killer* dobles (K1/K2). El empleo de estas cepas tiene varios problemas. El primero de ellos derivado de su alta especificidad, que implica por si mismo un número de cepas sensibles a su acción muy restringido. Otro problema es debido al pH óptimo para la producción y estabilidad de las toxinas (4.6-4.8 para la toxina K1) (Woods & Bevan, 1968). Esto hace que la toxina K1 no tenga mucha utilidad en la obtención de vino, ya que su empleo sería ineficaz. Sin embargo, la toxina K2 parece ser más útil en ese aspecto, además, presenta un rango de actividad más amplio, ya sea sobre cepas de *S. cerevisiae*, como otras cepas contaminantes no pertenecientes a dicho género.

1.8.2.- Aplicación terapéutica.

La incidencia del carácter *killer* en levaduras patógenas (*Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon*) es baja (3%) (Kandel & Stern, 1979), siendo nula la existencia de aislamientos de *Candida albicans* con carácter *killer* entre las 120 cepas testadas por estos autores. Sin embargo, otros autores, en 142 aislamientos realizados en muestras de heces, esputos, orina, sangre, etc y empleando un amplio espectro de cepas sensibles (en contraposición a Kandel & Stern, 1979 que tan sólo utilizan cepas de *Torulopsis* y *Candida*) detectan un 9% de cepas *killer*, entre ellas cepas de *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* y *Torulopsis glabrata* (Middelbeek *et al.*, 1980). Por tanto, el número de cepas *killer* en levaduras patógenas es menor que entre levaduras aisladas de ambientes naturales; no habiendo evidencias de que la posesión del carácter *killer* por algunas cepas patógenas esté relacionado en modo alguno con su carácter patógeno. Son varios los estudios realizados que indican que muchas levaduras patógenas (*C. albicans*, *T. glabrata*, *C. neoformans*) son sensibles a ciertas toxinas *killer*. La sensibilidad de *C. albicans*, la levadura patógena oportunista más frecuente en aislamientos clínicos, a la acción de las toxinas *killer* ha sido

estudiada en detalle. Cepas de dos especies de levadura, *Williopsis mrakii* y *Pichia anomala*, presentan actividad *killer* frente a esta. Walker *et al.*, (1995) han realizado un estudio sobre el efecto de 17 cepas, previamente testadas como *killer*, en levaduras patógenas. En este estudio se observa como la cepa *W. mrakii* NCYC 500 (toxina K-500) muestra un efecto *killer* marcado frente a varios aislamientos clínicos de *C. albicans* (Walker *et al.*, 1995; Hodgson *et al.*, 1995). También ha sido demostrado que la toxina producida por *P. anomala* podría tener utilidad terapéutica. Sawant *et al.*, (1988) estudian el efecto de la toxina de esta levadura en la tasa de crecimiento de *C. albicans*, observando *in vitro* una clara inhibición de esta. Posteriormente, (Séguy *et al.*, 1994 y 1996; Cailliez *et al.*, 1994) estudian la susceptibilidad de *Pneumocystis carinii* a la toxina de *P. anomala*; observando como la toxina es capaz de producir *in vitro* la inhibición del crecimiento de este protozoo.

Sin embargo, la antigenicidad de las toxinas (capaces de inducir una respuesta inmune), su alta inestabilidad a los pH y temperaturas fisiológicos hacen que las toxinas *killer* sean, *in vivo*, unos candidatos poco probables como antifúngicos terapéuticos. La búsqueda de cepas *killer* cuyas toxinas presenten una mayor estabilidad en estas condiciones ha tenido éxito relativo. La toxina KT28 de *S. cerevisiae*, que muestra comparativamente una mayor estabilidad, presenta cierta actividad inhibitoria en un estudio realizado sobre hongos y protozoos patógenos. Sin embargo, esta acción sólo se consigue a concentraciones 100 veces superiores a la necesaria para inhibir a una cepa sensible de levadura. En dicho estudio también se analiza el efecto de la toxina KT28 sobre diferentes factores fisiológicos animales (parámetros cardiovasculares, transmisión neuromuscular, etc) no encontrándose efecto alguno. Debido a la ausencia de estos efectos, la toxina podría consumirse oralmente. Sin embargo, la temperatura corporal, las proteasas existentes en el estómago y el pH elevado del duodeno inactivarían rápidamente la toxina pese a su mayor estabilidad (Pfeiffer *et al.*, 1988). Una solución a los problemas que surgirían a la hora de emplear las toxinas *killer* como agentes terapéuticos es la utilización de anticuerpos anti-idiotípicos frente a la toxina *killer* de *P. anomala* (Cailliez *et al.*, 1994; Séguy *et al.*, 1994; Séguy *et al.*, 1996). Los anticuerpos anti-idiotípicos producidos serían capaces de mimetizar la acción de la toxina (*antibodies*), no presentando los problemas de inactivación por pH y temperatura, ni de antigenicidad.

1.8.3.- Aplicación taxonómica.

De la misma forma que la resistencia/sensibilidad a las toxinas *killer* ha sido empleada para realizar una clasificación de las mismas, algunos autores han empleado la especificidad de las toxinas *killer* para su uso en taxonomía como un método rápido y eficaz para aportar nuevos datos a la, en algunos casos, difícil tarea de identificar ciertos microorganismos. Las referencias a este respecto son escasas y encaminadas a identificar microorganismos patógenos (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Nocardia asteroides*, etc).

Provost *et al.*, (1995) utilizan las toxinas producidas por diferentes cepas de levaduras *killer* para discernir fácilmente entre diferentes especies (previamente identificadas por métodos clásicos) pertenecientes al género *Nocardia* (*N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova*). En este estudio se pone de manifiesto que con el empleo de dos cepas *killer* (*Pichia mrakii* y *P. lynferdii*) sería suficiente para discernir entre ellas. *N. asteroides* sería sensible sólo a la toxina de *P. mrakii*, *N. nova* sería sensible a las dos cepas *killer* y *N. farcinica* sería resistente a las dos. De forma similar, en un estudio realizado sobre diferentes especies de levaduras patógenas (Morace *et al.*, 1984) se han obtenido resultados óptimos en cepas de *C. neoformans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* y *C. glabrata*. Sin embargo, los resultados obtenidos con los aislamientos de *C. parapsilosis* fueron negativos. Previamente estos mismos autores empleando aislamientos clínicos de *C. albicans* llegan a similares conclusiones, empleando la sensibilidad a ciertas cepas *killer* como método para identificar estos aislamientos (Polonelli *et al.*, 1983).

1.8.4.- Aplicación en manipulación genética.

Del mismo modo que diferentes tipos de antibióticos se emplean habitualmente en la selección bacterias transformantes, híbridos, etc; en el caso de las levaduras la resistencia/sensibilidad a la acción de las toxinas *killer* parece poder emplearse en el mismo sentido (Young, 1981). Actualmente estos procesos están basados en el uso de cepas parentales mutantes auxotróficos y/o deficientes en su respiración. La obtención de estos mutantes auxotróficos sin dañar el resto del genoma parece ser una tarea difícil. Las toxinas

killer podrían emplearse como un método de seleccionar cepas sometidas a transformación, fusión de protoplastos (híbridos/cíbridos), etc (Figura 1.5).

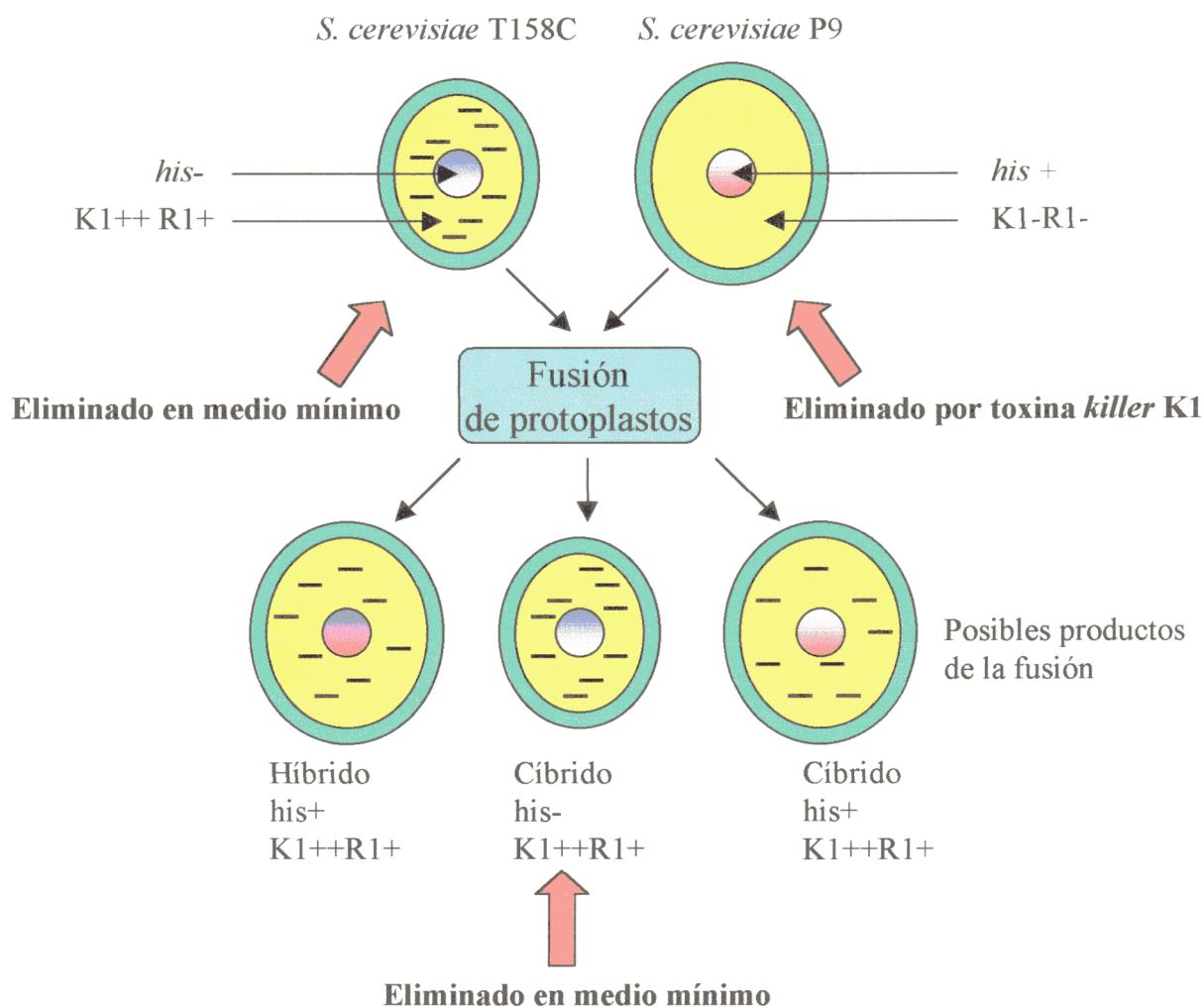


Figura 1.5.- Ejemplo de la utilización del carácter *killer* como carácter para realizar un proceso de selección. Fusión de protoplastos de una cepa haploide *killer* (*S. cerevisiae* T158C) con una cepa sensible (*S. cerevisiae* var. *uvarum* P9). (Vondrejs *et al.*, 1996).

Para el empleo de las toxinas *killer* como método de *screening* será necesario tener en cuenta ciertas características peculiares de estas. Por ejemplo, es obvio que las toxinas *killer* codificadas en el cromosoma de las células no podrían ser empleadas para la selección de cibridos, también se debiera tener en cuenta la presencia del receptor de pared necesario para el tipo de toxina en concreto que se desea emplear, etc (Vondrejs *et al.*, 1996).

1.8.5.- Aplicación en biodeterioro.

Existen muy pocas referencias en las cuales se haya estudiado el posible efecto beneficioso de las levaduras *killer* en el biodeterioro de algún tipo de material o proceso industrial. Walker *et al.*, (1995) estudian la inhibición por levaduras *killer* del crecimiento de ciertos hongos filamentosos que producen deterioro en la madera y enfermedades en plantas. Estos autores han observado que las toxinas de *P. anomala* y *S. cerevisiae* son muy efectivas a la hora de controlar el crecimiento de ciertos hongos como *Ophiostoma ulmi* agente causante de la enfermedad del olmo alemán. *S. cerevisiae* fue la levadura con mayor capacidad inhibitoria sobre los hongos filamentosos testados (*Serpula lacrymans*, *Postia placenta*, *Lentinus lepideus*, *Rhizoctonia solani*, *Fussarium equiseti*, *Botrytis fabae* y *Phytophthora infestans*). *B. cinerea* fue resistente a la inhibición por levaduras *killer*.

Otras toxinas *killer* también han sido empleadas con éxito. La actividad *killer* de *Kluyveromyces lactis* ha sido empleada para prevenir el biodeterioro aeróbico de ensilados causado por levaduras. En condiciones anaerobias, las bacterias lácticas producen la fermentación de los ensilados convirtiendo los azúcares solubles en ácido acético y láctico. Esta acidificación previene el posterior biodeterioro del ensilado por bacterias. Si por manipulación poco adecuada el ensilado es expuesto al aire, se produce el biodeterioro del mismo por microorganismos aerobios que degradan el ácido láctico y los carbohidratos solubles en CO₂, e hidrolizan las proteínas y los aminoácidos a aminas, amidas y amoniaco. Como consecuencia, se produce calentamiento del ensilado, aumento del pH y disminución de la digestibilidad. En este biodeterioro las levaduras capaces de asimilar lactato juegan un papel muy importante. Para controlar su crecimiento se ha empleado una cepa *killer* de *K. lactis* y prevenir así este biodeterioro. Sin embargo, esta cepa debido a su capacidad de

asimilar lactato es capaz, por si misma, de causar el biodeterioro del ensilado. Por ello, se han obtenido mutantes deficientes en la respiración (que no pueden asimilar lactato) pero estos mutantes no han sido capaces de crecer adecuadamente, no apareciendo actividad *killer*. Por tanto, investigaciones complementarias son aun necesarias (Kitamoto *et al.*, 1993).

II.- OBJETIVOS

Las levaduras *killer*, pese a su descubrimiento en 1963, aun no han sido estudiadas a fondo en su mayor parte; sólo la toxina K1 de *S. cerevisiae* ha sido caracterizada completamente, aunque queden algunas lagunas fundamentalmente en el conocimiento de su modo de acción. La toxina *killer* de *Pichia membranifaciens* no ha sido caracterizada en ningún aspecto previamente; sólo en nuestro grupo de trabajo se han determinado con anterioridad ciertas características relacionadas con la actividad de la toxina en presencia de cloruro sódico y su espectro de actividad *killer* (Llorente, 1997). El objetivo fundamental del trabajo presentado es la caracterización de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106, haciendo hincapié en su acción sobre la levadura sensible *Candida boidinii* IGC 3430; acción que tiene como característica peculiar el que sólo se produce en presencia de cloruro sódico. Así, los objetivos planteados que se tratan de alcanzar son los siguientes:

- 1.- Caracterización de los parámetros cinéticos de producción de toxina *killer* para un mejor conocimiento encaminado a la mejora de la producción de toxina.
- 2.- Búsqueda de los medios de cultivo, condiciones y aditivos que incrementen la producción de toxina *killer*.
- 3.- Estudio de la naturaleza y propiedades físico-químicas de la toxina *killer*.
- 4.- Purificación de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106.
- 5.- Ubicación de la información genética que codifica para la toxina *killer*.
Experiencias de curación del factor *killer*.
- 6.- Caracterización del receptor primario de la toxina en la pared de la levadura sensible *C. boidinii* IGC 3430.
- 7.- Determinación de los efectos de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 sobre las células sensibles de *C. boidinii* IGC 3430.

III.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Microorganismos.

Las levaduras empleadas para este estudio fueron: *Pichia membranifaciens* CYC 1106 (Complutense Yeast Collection, Madrid), como levadura con actividad *killer*; y como levadura sensible, a la acción de dicha actividad, se ha empleado *Candida boidinii* IGC 3430 (Instituto Gulbenkian de Ciencia).

3.2.- Mantenimiento de los microorganismos.

Las levaduras empleadas se mantuvieron en tubos con medio YMA en hisel (*Yeast Morphology Agar*) a una temperatura de 20°C, resemebrándose periódicamente.

Para preservar las cepas durante largos periodos de tiempo estas se mantuvieron en nitrógeno líquido (-196°C), utilizando como crioprotector glicerol al 10% (v/v).

3.3.- Medios de cultivo.

3.3.1.- Medio de mantenimiento: Medio YMA (*Yeast Morphology Agar*).

Glucosa anhidra	10.0 g
Proteosa peptona No.3 (Difco) . . .	5.0 g
Extracto de levadura (Difco)	3.0 g
Extracto de malta (Difco)	3.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

El medio líquido correspondiente (YMB: *Yeast Morphology Broth*) no lleva agar entre sus componentes. Estos medios se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.3.2.- Medio de detección de actividad *killer*: Medio YMA-MB (YMA-*Methylene Blue*).

El medio base contenía los mismos componentes que el YMA incorporando:

NaCl	60.0 g
Acido cítrico	6.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	16.1 g
Azul de metileno	0.5 ml*
Agua destilada	1000 ml

* Solución de azul de metileno al 1.5 % (p/v). El azul de metileno facilita la observación de la actividad *killer*. La adición de NaCl al medio permite observar la actividad *killer* de ciertas levaduras que de otro modo quedaría enmascarada. El medio se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. El pH final del medio es 4.0.

3.3.3.- Medios para la producción de toxina *killer*.

Los siguientes medios de cultivo se emplearon para seleccionar aquellos que proporcionaran una mayor producción de toxina, así como una buena actividad específica para facilitar la purificación de la toxina *killer*.

YMB-tamponado (*Yeast Morphology Broth*):

Este medio presenta los mismos componentes del medio YMB y está tamponado con tampón citrato-fosfato pH 4.0, tampón que mantiene las condiciones de cultivo en pH ácidos.

Acido cítrico	6.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	16.1 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

YPD (*Yeast proteose Peptone Dextrose*):

Glucosa anhidra 10.0 g
Extracto de levadura (Difco) 10.0 g
Proteosa peptona No.3 (Difco) . . 10.0 g
Acido cítrico 6.0 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 16.1 g
Agua destilada 1000 ml
- pH 4.0
- Esterilización en autoclave 121°C, 20 min.

Gorodkova modificado*:

Glucosa anhidra 10.0 g
Proteosa peptona No.3 (Difco) . . 10.0 g
 ClNa 5.0 g
Acido cítrico 6.0 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 16.1 g
Agua destilada 1000 ml
- pH 4.0
- Esterilización en autoclave 121°C, 20 min.

*El medio de Gorodkova, empleado habitualmente para facilitar la esporulación en levaduras, contiene 1 g/l de glucosa.

YNB (*Yeast Nitrogen Base*):

Glucosa anhidra 10.0 g
Yeast Nitrogen Base (Difco) 6.7 g
Acido cítrico 6.0 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 16.1 g
Agua destilada 1000 ml
- pH 4.0

- La esterilización se realizó por filtración utilizando filtros Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro.

Medio K:

- Medio base:

Glucosa anhidra	10.0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0 g
KH_2PO_4	5.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.1324 g
Acido cítrico	6.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	16.1 g
Agua destilada	1000 ml

- Solución de vitaminas 0.5 ml

- Solución A de oligoelementos . . 0.5 ml

- Solución B de oligoelementos . . 0.5 ml

- pH 4.0

- La esterilización se realizó por separado mediante filtración de las tres soluciones stock. El medio base se esterilizó en autoclave (121°C, 20 min). Una vez estériles se preparó el medio añadiendo 0.5 ml de cada solución stock al medio base.

Preparación de soluciones stock:

Solución de vitaminas.

Biotina	0.01 g
Pantotenato de calcio	0.8 g
Inositol	40.0 g
Niacina	1.6 g
Piridoxina (HCl)	1.6 g
Tiamina (HCl)	1.6 g
Agua destilada	1000 ml

Solución A de oligoelementos.

H_3BO_3	1.0 g
KI	0.2 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
Agua destilada	1000 ml

Solución B de oligoelementos.

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.08 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.8 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.8 g
Agua destilada	1000 ml
- pH 3	

3.4.- Preparación de disoluciones tampón.

El tampón utilizado en la mayoría de las experiencias realizadas fue el citrato-fosfato. Se utilizaron dos soluciones *stock*, una preparada con 9.6 g de ácido cítrico anhidro en 500 ml de agua destilada, y otra, con 15.79 g de fosfato bisódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) en 500 ml. Según el rango de pH empleado se mezclaron ambas soluciones en la proporción adecuada. Otras soluciones tampón empleadas de forma puntual en algunos ensayos se detallan de forma precisa en cada caso.

3.5.- Valoración de proteínas y carbohidratos.

A 800 μl de muestra, convenientemente diluida, se añadieron 200 μl del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a $\lambda = 595 \text{ nm}$ utilizando como blanco un control formado por 800 μl de agua y 200 μl del reactivo de Bradford. Para obtener una correlación entre absorbancia y cantidad de proteína se realizó una curva patrón utilizando albúmina de suero bovino en diferentes concentraciones. El ensayo descrito es válido para concentraciones de proteínas entre 1 y 25

µg/ml.

Para la valoración de carbohidratos totales se empleó el método de la antrona empleando glucosa como patrón. El reactivo A se preparó añadiendo, lentamente y en baño de hielo, 750 ml de ácido sulfúrico concentrado a 200 ml de agua desionizada. El reactivo B se preparó con 200 mg de antrona disueltos en 100 ml de reactivo A. Para determinar los carbohidratos se añadieron 60 µl de la muestra a 300 µl de reactivo B. La mezcla se agitó y se hirvió durante 10 minutos. Tras enfriar y agitar la muestra se determinó su absorbancia a 660 nm.

3.6.- Determinación de la actividad *killer*.

La actividad *killer* se determinó utilizando el medio YMA-MB. Una suspensión celular de 10⁶ células/ml de la cepa sensible (*Candida boidinii* IGC 3430) se extendió sobre la superficie del medio formando un cespéd homogéneo. 40 µl de la muestra a determinar su actividad se depositaron sobre discos de antibiograma de 6 mm de diámetro de papel Whatman AA. Después de tres días de incubación de las placas de actividad, a 20°C, se determinó el diámetro de la zona de inhibición. Bajo las condiciones empleadas, el diámetro de la zona de inhibición se consideró como una medida de la actividad *killer* y fue transformado en unidades arbitrarias de actividad *killer* (UA).

3.6.1.- Relación entre el diámetro de halo y las unidades arbitrarias de actividad *killer*.

De forma similar a los ensayos de actividad con antibióticos, es necesario determinar la relación entre los milímetros de halo que se observan en las placas de actividad y la cantidad de toxina que se aplica en los discos. Para ello, se determinó la actividad de cantidades sucesivas de toxina observando al cabo de los tres días el diámetro de halo que estas cantidades habían generado.

3.7.- Estudio de la cinética de producción de toxina *killer*.

Este estudio se realizó en cultivos en *batch* empleando matraces de 6 litros de capacidad con un volumen de 3 litros de medio de cultivo. Como inóculo se utilizó un cultivo en fase exponencial crecido en YMB. Los cultivos de *P. membranifaciens* se incubaron a 20°C y con una agitación de 150 rpm. Cada hora, se determinó la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 600 nm, al mismo tiempo se tomaron muestras de 100 ml de cultivo para la determinación de la actividad. Dichas muestras se centrifugaron (5000 rpm, 5 min, 0°C), el sobrenadante obtenido se precipitó con etanol a una concentración del 70% a 0°C. A continuación, se centrifugó a 7000 rpm, 0°C y el *pellet* obtenido se liofilizó. El *pellet* se resuspendió en 0.5 ml de tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0. Se tomaron alíquotas de 40 µl para determinar la actividad *killer* en el medio de detección de actividad empleado habitualmente. Al mismo tiempo, se determinó la cantidad de proteínas presentes por el método de Bradford.

3.8.- Optimización de la producción de toxina *killer* en diferentes medios suplementados.

Como inóculo de partida para los matraces en los que se realizó el crecimiento de la cepa *killer*, se hizo crecer dicha levadura en medio YMB a 20°C y 125 rpm durante 14 h. La densidad óptica (600 nm) inicial de los cultivos tras la adición del inóculo fue, aproximadamente, de 0.1. El cultivo se realizó en matraces de un volumen total de 250 ml con 100 ml de medio. Las tasas de crecimiento de la levadura en las distintas condiciones de crecimiento se determinaron a partir de las medidas de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 600 nm a intervalos de 1 hora.

El medio de cultivo seleccionado por su óptimo rendimiento en la producción de toxina fue modificado con diferentes aditivos, variando además, las condiciones de cultivo para una mejora de la producción de la toxina *killer*. Las condiciones de cultivo estudiadas fueron las siguientes:

- Temperatura: 20, 25 y 30°C.
- Agitación: 100, 150, 200 y 250 rpm.
- pH: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0.

Los aditivos incorporados a los cultivos para mejorar la producción fueron los que se detallan a continuación expresados en % (p/v):

- Triton X-100 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Tween 80 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Brij 58 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Plurónico F-127 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Polietilen glicol-400 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Polietilen glicol-1500 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Polietilen glicol-6000 (0.001%, 0.01% y 0.1%).
- Urea (1%, 2% y 3%).
- Glicerol (1%, 5% y 10%).
- Sorbitol (1%, 5% y 10%).
- PMSF (*Phenylmethysulphonyl fluoride*) (0.001%, 0.01% y 0.1%).

La actividad de la toxina *killer* presente en los cultivos se determinó cuando la D.O. ($\lambda = 600$ nm) alcanzó el valor de 1.0. En dicho momento, al final de la fase exponencial de crecimiento, se filtraron 10 ml de cada uno de los cultivos, empleando filtros de 0.45 μm , y posteriormente se precipitaron con etanol absoluto a una concentración final del 70% a 0°C. A continuación, se centrifugaron a 7000 rpm, 0°C y el *pellet* obtenido se liofilizó. El *pellet* se resuspendió en 0.5 ml de tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0. 40 μl se utilizaron para determinar la actividad *killer* en medio YMA-MB. Simultáneamente, se determinó la cantidad de proteínas presentes. Por otro lado, se determinó la biomasa presente en dicho momento en los cultivos calculando el peso seco de la misma. El peso seco se obtuvo filtrando 10 ml de cultivo empleando filtros de 0.45 μm , lavando con 10 ml de agua y dejando estos secar durante 24 horas a 60°C y calculando el peso seco por pesada en balanza de precisión.

3.9.- Actividad y estabilidad de la toxina *killer*.

3.9.1.- Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de la toxina *killer*.

3.9.1.1.- Efecto de la temperatura en la actividad de la toxina.

Para asegurar una completa difusión de la toxina en el medio empleado para detectar la actividad (YMA-MB) y antes de la sembrar el cespel de la levadura sensible se depositaron, sobre los discos de papel, 40 µl de toxina *killer* de un sobrenadante concentrado de un cultivo y fueron incubadas a 4°C durante 24 horas. Después, las placas se sembraron con la cepa sensible (*C. boidinii*) y se incubaron a diferentes temperaturas desde 5 a 35°C con intervalos de 5°C.

3.9.1.2.- Efecto de la temperatura en la estabilidad de la toxina.

Las muestras de 1 ml de un sobrenadante de cultivo concentrado se incubaron a diferentes temperaturas (entre 5 y 35°C a intervalos de 5°C). Cada 24 horas durante un periodo total de siete días se tomaron muestras de 40 µl que se utilizaron para determinar la actividad a una temperatura constante de 20°C.

3.9.2.- Efecto del pH en la actividad y estabilidad de la toxina *killer*.

3.9.2.1.- Efecto del pH en la actividad.

Se sembraron en cespel placas para detectar la actividad *killer* con valores de pH ajustados entre 3.0 y 7.5 a intervalos de 0.3 unidades de pH. Se depositaron 40 µl de un concentrado de toxina *killer* y se incubaron a 20°C. El diámetro de la zona de inhibición se determinó tras una incubación de tres días.

3.9.2.2.- Efecto del pH en la estabilidad.

El pH de sobrenadantes concentrados de cultivos (1 ml) se ajustó a valores entre 3.0 y 7.5. Se tomaron muestras de los sobrenadantes (40 µl) cada 24 horas durante 7 días y la actividad *killer* se determinó en placas de YMA-MB (con un pH constante de 4.0).

3.9.3.- Efecto del NaCl y KCl en la actividad de la toxina *killer*.

El desarrollo del ensayo se realizó del mismo modo que el descrito en el apartado 3.6, pero utilizando concentraciones de NaCl y KCl entre 0 y 1.0 M en el medio YMA-MB.

3.9.4.- Estabilidad al pH y a la temperatura en presencia de NaCl.

3.9.4.1.- Estabilidad a la temperatura en presencia de NaCl.

Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.9.1.2 empleando concentraciones de NaCl del 0, 3 and 6% (p/v). Las temperaturas de ensayo fueron 15, 20, 25 y 30°C.

3.9.4.2.- Estabilidad al pH en presencia de NaCl.

La estabilidad de la toxina se determinó empleando alícuotas de 1 ml de la toxina *killer* procedente del sobrenadante concentrado de un cultivo, ajustando el pH a diferentes valores prefijados (4.8, 5.1, 5.4, 5.7 y 6.0) y variando la concentración de NaCl a valores de 0, 3 y 6% (p/v).

3.10.- Naturaleza de la actividad *killer* de *P. membranifaciens*.

Para determinar si la naturaleza de la toxina *killer* producida por la cepa de *P. membranifaciens* CYC 1106 era protéica, al igual que otras toxinas descritas, se sometió la toxina a la acción de distintas proteasas.

Las proteasas empleadas fueron pronasa, papaína y pepsina. La pronasa se resuspendió en agua destilada con 5 mM CaCl₂, la papaína en agua destilada con L-cisteína 15 mM, EDTA 6 mM y la pepsina se disolvió en agua destilada; según se describe en Young, T.W. & Yagiu, M., 1978. Para determinar la concentración necesaria de cada proteasa para alcanzar un mismo grado de proteólisis en las condiciones ensayadas, se procedió del siguiente modo: a 1 ml de solución de proteasa se añadió 1 ml de tampón citrato-fosfato 0.1 M, pH 4.0 y 1 ml de una solución de hemoglobina al 2.5% (p/v) en agua destilada. Se incubó durante 20 horas a 20°C y después se añadieron 5 ml de una solución de ácido tricloroacético al 4% (p/v) y se filtró (0.22 µm). A continuación, se determinó la absorbancia del sobrenadante a $\lambda = 280$ nm, utilizando como control una solución de hemoglobina al 2.5% (p/v) (1 ml) en el mismo tampón citrato-fosfato (1 ml) añadiendo el ácido tricloroacético 4 % (p/v) previo a la incorporación de 1 ml de la solución de proteasa (tiempo cero).

Las concentraciones de cada una de las proteasas para obtener un mismo grado de degradación en las condiciones de ensayo descritas, y de este modo, poder comparar la eficacia de las proteasas en degradar o no la toxina *killer* y demostrar su naturaleza protéica, fueron: pronasa, 1.7 mg/ml; papaína, 0.6 mg/ml y pepsina, 0.57 mg/ml.

Una vez establecidas estas concentraciones se procedió de modo similar utilizando las toxinas *killer* como sustrato para la actividad de las proteasas, en lugar de hemoglobina. Se añadió 1 ml de una solución de toxina *killer* en tampón citrato-fosfato 0.05 M, pH 4.0 a 0.5 ml de la solución de proteasa y se incubó durante 20 horas a 20°C y después se emplearon 40 µl para determinar la actividad *killer*.

Como control se utilizaron las proteasas desnaturalizadas en autoclave a 105°C, 10 min. Se añadió a 1 ml de la solución de toxina *killer* 0.5 ml de enzima desnaturalizada, se incubó y se determinó la actividad como anteriormente se ha descrito. Se utilizaron otros controles para determinar el posible efecto sobre la actividad *killer* de las soluciones en las cuales iban resuspendidas las proteasas. Para ello se mezclaron por separado 0.5 ml de cada una de dichas soluciones (5 mM CaCl₂, L-Cisteína 15 mM con EDTA 6 mM y agua destilada) con 1 ml de toxina. Se incubó y se determinó la actividad *killer*.

3.11.- Determinación del punto isoelectrico (PI).

3.11.1.- Isoelectroenfoque preparativo.

Los isoelectroenfoques (IEF) preparativos se realizaron utilizando como soporte Ultrodex (Pharmacia), un tipo de dextrano purificado para la realización de isoelectroenfoque preparativo en gel granulado. El rango de pH empleado fue de 2.5 a 5 unidades. Los IEF preparativos se emplearon en la purificación de la toxina *killer*.

3.11.1.1.- Preparación de los geles.

El gel se preparó de acuerdo a la siguiente composición: 2.0 g de Ultrodex, 1.0 ml de anfolitos Pharmalyte (Pharmacia) (pH 2.5-5.0), 0.5 g de glicina y 49.0 ml de agua destilada. Una vez preparado el gel, este se depositó sobre un soporte de cristal (20 cm X 10 cm X 1 cm) y se dejó reposar hasta perder como máximo un 35% de su peso inicial para que gelificara.

3.11.1.2.- Preparación de las muestras.

Las muestras se solubilizaron en agua y, tras el preenfóque, se aplicaron directamente sobre el gel a una distancia aproximada de 1.5 cm del cátodo (polo negativo).

3.11.1.3.- Desarrollo del isoelectroenfoque.

Se colocaron tiras de papel Whatman nº3 humedecidas con NaOH 1.0 M y H_3PO_4 0.5 M en el cátodo y en el ánodo, respectivamente. Se realizó un preenfoque sin muestra aplicando una corriente de 8 W de potencia constante durante 1 hora. El enfoque se realizó a 10 W de potencia constante durante 7 horas. Todo el proceso se realizó a una temperatura de 4°C.

3.11.1.4.- Determinación del punto isoelectrico.

Para la determinación del punto isoelectrico de la toxina el gel se dividió en secciones de 4 mm que se eluyeron en 2 ml de agua destilada. El gel se retiró por centrifugación a 3.000 rpm, 1 min. El pH y la actividad *killer* se determinaron a partir del sobrenadante obtenido.

3.11.2.- Isoelectroenfoque analítico.

Se realizó utilizando como soporte placas horizontales y empleando un rango de pH de 2.5 a 5 unidades.

3.11.2.1.- Formación de los geles.

La formación de los geles se realizó utilizando un formador de geles de 12 cm X 6.5 cm X 0.4 mm (Bio-Rad). La composición de los geles fue la siguiente: 2.0 ml de una solución de acrilamida/bisacrilamida (24.25% / 0.75%), 0.5 ml de anfolitos (2.5-5.0) Pharmalyte, 2.0 ml de glicerol al 25% (v/v), 150 µl de persulfato amónico al 10% (p/v), 35 µl de TEMED y 5.5 ml de agua destilada.

3.11.2.2.- Preparación de las muestras.

Las muestras de toxina purificada se dializaron frente a agua, se concentraron

y se aplicaron al gel mediante pequeñas tiras de papel Whatman n°3 colocadas a 1.0 cm del cátodo.

3.11.2.3.- Procedimiento.

El gel se colocó invertido directamente sobre los electrodos. En primer lugar, se realizó un preenfoco sin muestra, durante 15 min a un voltaje constante de 125 voltios. A continuación, se aplicaron las muestras y se realizó el enfoque de la manera siguiente:

- 100 voltios durante 15 min.
- 200 voltios durante 15 min.
- Se retiraron los aplicadores de las muestras.
- 450 voltios durante 45 min.

Todo el proceso se realizó a una temperatura de 4°C.

3.11.2.4.- Determinación del punto isoelectrico.

Para la determinación del punto isoelectrico de la toxina se midió el gradiente de pH establecido en el gel de poliacrilamida con un electrodo de contacto y se representó frente a la distancia al cátodo, también, el pH fue determinado dividiendo el gel de isoelectroenfoco en lonchas, dejandolas eluir en agua destilada durante toda la noche a 4°C y determinando el valor de pH con un electrodo. Así, se pudo determinar el punto isoelectrico de la toxina purificada a partir de la distancia recorrida. Los geles de isoelectroenfoco se tiñeron con azul de Coomassie R-250.

3.11.2.5.- Tinción de proteínas en geles de isoelectroenfoco analítico.

Después de realizar el isoelectroenfoco analítico en gel de poliacrilamida, en primer lugar, el gel se fijó durante 60 minutos en una solución al 5% (p/v) de ácido

sulfosalicílico en ácido tricloroacético al 10% (p/v). Posteriormente, se situó el gel en una solución de metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:6) durante 30 minutos, a continuación se tiñó en agitación durante 4 horas en una solución al 0.2% (p/v) de azul de Coomassie R-250 en metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:6). Tras la tinción el gel se destiñó en metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:6) hasta observar un fondo transparente.

3.12.- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron en condiciones desnaturalizantes, en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS) según el método descrito por Laemmli, U.K. (1970).

3.12.1.- Formación de los geles.

Los geles estaban formados por un gel de concentración y un gel de separación. Para los geles de separación el porcentaje utilizado fue del 12%. También se utilizaron geles en gradiente del 4% al 20% (Bio-Rad).

- Composición del gel concentrante (5%): se mezclaron 1.4 ml de agua con 0.33 ml de solución una de acrilamida/bisacrilamida (29%/1%), 0.25 ml de tampón Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8, 20 µl de SDS, 20 µl de persulfato amónico al 10% (p/v) y 2 µl de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina).

- Composición del gel de separación (12%): se mezclaron 1.6 ml de agua con 2.0 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida (29%/1%), 1.3 ml de tampón Tris-HCl 1.0 M, pH 8.8, 50 µl de SDS, 50 µl de persulfato amónico al 10% (p/v) y 2 µl de TEMED.

3.12.2.- Preparación de las muestras.

Las muestras se disolvieron en un tampón cuya composición era la siguiente: 4 ml de

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.8 ml de glicerol, 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.05% y agua destilada hasta 6 ml. Para las electroforesis en condiciones desnaturizantes se añadieron 1.6 ml de SDS al 10% y 0.8 ml de 2-mercaptoetanol. En dichas condiciones, las muestras preparadas se hirvieron durante 5 minutos antes de su aplicación en el gel.

3.12.3.- Procedimiento.

Se utilizó el sistema mini-PROTEAN II de Bio-Rad. El tampón de electroforesis (10X) se preparó mezclando 144 g de glicina, 10 g de SDS y 30 g de Tris por litro de disolución. A partir de dicho stock se preparó el tampón de electroforesis diluyendo 10 veces con agua destilada.

Para los geles descritos anteriormente se utilizó, durante el proceso de concentración, un voltaje de 80 Voltios y el resto del desarrollo de la electroforesis se realizó a 120 Voltios.

3.12.4.- Tinción de proteínas en geles de electroforesis con Coomassie R-250.

Se preparó una solución de azul de coomassie R-250 pesando 1.25 g de azul de Coomassie y disolviéndolo en una solución formada por metanol (227 ml), ácido acético (46 ml) y agua destilada (227 ml). Dicha solución se filtró y se utilizó como *stock* para la tinción de los geles.

Una vez realizada la electroforesis se situó el gel en dicha solución y se tiñó durante 30 minutos en agitación. Se retiró el colorante y el gel se destiñó con una solución decolorante formada por metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:7) hasta la aparición de un fondo claro.

3.12.5.- Tinción de glicoproteínas por el método del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS).

Tras la realización de una electroforesis en condiciones desnaturizantes el gel de

poliacrilamida se sumergió en una solución de ácido fosfotúngstico al 5% (p/v) en HCl 2N. Durante 90 minutos el gel se incubó a temperatura ambiente con agitación. El gel se escurrió y se situó en una solución de metanol al 7% y ácido acético al 14% en agua durante 60 minutos. A continuación, se repitió el paso anterior. Una vez escurrido, el gel se incubó durante 60 minutos en una solución de ácido periódico al 1% (p/v) en ácido tricloroacético al 7%. Escurrir el gel. El exceso de ácido periódico se retiró con 250 ml de metabisulfito sódico al 0.5% (p/v) en 0.1 N de HCl a temperatura ambiente. Incubar hasta que desaparezca el color ambar del gel (aproximadamente 60 minutos) y escurrir el gel. Por último el gel se tiñió con el reactivo de Schiff (Sigma) en oscuridad a 4°C toda la noche. La aparición de las bandas de color púrpura, que denotan la presencia de glicoproteínas, es gradual y dichas bandas son estables durante 3-4 días (Leach, B.S. *et al*, 1990).

3.12.6.- Determinación de la masa molecular.

La determinación de la masa molecular se realizó en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas patrón utilizadas (Bio-Rad) fueron: miosina (200.000 Da), β -galactosidasa de *Escherichia coli* (116.250 Da), fosforilasa B de musculo de conejo (97.400 Da), albúmina de suero bovino (66.200 Da), ovoalbúmina (45.000 Da), anhidrasa carbónica bovina (31.000 Da), inhibidor de tripsina de soja (21.000 Da), lisozima (14.400 Da) y aprotinina (6.500 Da).

Se construyó en cada caso una curva de calibrado representando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada proteína frente a su Rf. De esta manera, determinando en electroforesis desnaturalizante el valor del Rf de la toxina purificada se pudo calcular su masa molecular.

3.13.- Electroforesis de poliacrilamida en condiciones nativas.

Debido al punto isoeléctrico de la toxina *killer* y a su baja estabilidad a valores de pH superiores a 4.8, las electroforesis nativas se realizaron en unas condiciones de pH ácidas y a 4°C. El tampón empleado fue el láctico-lactato pH 2.5, para que pudiera existir migración de la toxina en el gel (PI: 3.91) y la toxina permaneciera con actividad. Los geles se realizaron

a concentraciones del 6% de acrilamida.

3.13.1.- Formación de los geles.

Los geles se prepararon de acuerdo con la siguiente composición: 1.0 ml de acrilamida/bisacrilamida 30%, 2.6 ml de agua; 1.3 ml de tampón láctico-lactato 0.1 M, pH 2.5; 50 µl de persulfato amónico al 10% y 15 µl de TEMED.

3.13.2.- Preparación de las muestras.

Las muestras se disolvieron en el tampón de muestra siguiente: 1.0 ml tampón láctico-lactato 0.1 M, pH 2.5; glicerol 0.8 ml; agua 5.8 ml. Debido a la ausencia de gel concentrante las muestras se concentraron al máximo para una aplicación más puntual.

3.13.3.- Procedimiento.

Se utilizó el sistema mini-PROTEAN II de Bio-Rad. El tampón de electroforesis se preparó diluyendo diez veces el tampón láctico-lactato 0.1 M, pH 2.5 con agua destilada. Para los geles descritos anteriormente se utilizó un voltaje de 200 Voltios durante 2 horas a 4°C.

3.13.4.- Valoración de la actividad *killer* en los geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

La determinación de la actividad *killer in-situ* se realizó de la misma forma que la determinación de la actividad *killer* de extractos concentrados, sustituyendo los discos de papel de filtro por las secciones del gel de electroforesis en condiciones nativas. La tinción de proteínas de estos geles se realizó de la misma forma que en los geles en condiciones desnaturalizantes.

3.14.- Métodos de precipitación y concentración de proteínas.

3.14.1.- Ultrafiltración tangencial.

Este método se empleó para concentrar las proteínas existentes en el medio de cultivo (3 litros) después de tres días de crecimiento con la levadura *killer*. El medio de cultivo centrifugado para retirar las células (5000 rpm, 10 min, 4°C) se filtró (filtros Millipore de 0.45 µm), se añadió glicerol hasta alcanzar un 10% (v/v) y, por último, se sometió a ultrafiltración tangencial (Filtron). Los filtros empleados tuvieron un diámetro de poro de 10000 Da. Los 3 litros de medio de cultivo empleados en cada proceso se concentraron a 4°C hasta un volumen final de 75 ml (40X) y a continuación se dializaron frente a tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0 empleando el mismo sistema de ultrafiltración.

3.14.2.- Precipitación de proteínas.

Se han empleado diferentes métodos de precipitación de proteínas para la optimización de la purificación de la toxina *killer* de *P. membranifaciens*. De todos ellos la precipitación con etanol absoluto fue la que dio mejores resultados, por ello, fue la empleada de forma rutinaria.

3.14.2.1.- Precipitación fraccionada con etanol.

A un determinado volumen de extracto extracelular concentrado por ultrafiltración tangencial se añadió etanol a 0°C hasta obtener unas concentraciones finales del 45 y 75% (v/v). El proceso se realizó en baño de hielo y en agitación constante añadiendo etanol lentamente sobre el extracto concentrado. Tras alcanzar la concentración deseada (45%) la mezcla se dejó agitando durante 30 minutos tras los cuales se centrifugó a 7000 rpm, 10 min, 0°C. El precipitado obtenido se liofilizó para eliminar el etanol y se disolvió en tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0, determinándose su actividad *killer*. El sobrenadante obtenido tras precipitar al 45% se llevó a una concentración final del 75% de etanol y se procedió con él de la misma forma.

3.15.- Cromatografía de afinidad en β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano-epoxi-Sepharosa 6B.

Como técnica para la purificación de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* se empleó la cromatografía de afinidad basada en la capacidad de la toxina producida por esta levadura de unirse a los β -D-(1 \rightarrow 6)-glucanos de la pared de la levadura sensible *C. boidinii* IGC 3430.

Se empleó 1 gramo de Sepharosa 6B epoxi-activada (Sigma). El gel de cromatografía se resuspendió en agua adquiriendo un volumen aproximado de 3 ml. Este gel se lavó en primer lugar con 200 ml de agua durante 1 hora. A continuación, para realizar la unión con los β -D-(1 \rightarrow 6)-glucanos purificados, el gel se lavó con 20 ml de NaOH 0.1 M (ajustando el pH a 11.5 con carbonato sódico) y se incubó con 40 mg de β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano disuelto en 15 ml de NaOH 0.1 M (pH 11.5) durante 20 horas a 35°C con agitación. Tras este proceso el gel se lavó consecutivamente con 0.1 M NaOH, agua destilada, tampón borato sódico 0.1 M (pH 8.0, 0.5 M NaCl), y tampón acetato sódico 0.1 M (pH 4.0, 0.5 M NaCl). Para inactivar los posibles sitios de unión remanentes (grupos oxirano) se lavó el gel con etanolamina 1 M, pH 8.0 en agitación durante toda la noche. Antes de su empleo el gel se equilibró lavando varias veces con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 3.5, con un 15 % (p/v) de glicerol. La toxina *killer* adsorbida a la columna se eluyó de esta empleando el mismo tampón a pH 5.0 con NaCl 1.5 M. Las fracciones recogidas fueron de 1 ml y se ajustaron rápidamente a pH 4.0 con tampón citrato-fosfato 0.5 M. Se determinó la actividad y la cantidad de proteínas presentes en las fracciones dializadas frente a tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0.

3.16.- Estudio del receptor primario para la toxina *killer* en *Candida boidinii*.

3.16.1.- Obtención de paredes celulares de *Candida boidinii*.

Las paredes celulares se obtuvieron siguiendo el método descrito por Fleet, G.H. & Phaff, H.J. (1973). Se cultivó la cepa de *Candida boidinii* CYC 1062 en medio YMB utilizando matraces de 6 litros de capacidad con 3 litros de medio de cultivo. El volumen total empleado fue de 15 litros. Tras 5 días de cultivo a 30°C y 100 rpm, se centrifugaron las células a 5000 rpm, 5 minutos. Se desechó el sobrenadante, las células así obtenidas se

lavarón 3 veces con tampón TRIS-HCl 0.1 M, pH 8.5 y se liofilizaron. Una vez liofilizadas, se calculó el peso seco de la biomasa obtenida.

A continuación, se procedió a la ruptura mecánica de las células. Se mezclaron 15 g del liofilizado con igual peso de bolas de vidrio (Sigma) de 425 a 600 micras de tamaño. La ruptura se realizó en un omni-mixer (Sorval) a 4000 revoluciones por minuto durante 30 minutos. El proceso se realizó en presencia de N₂ líquido para evitar calentamiento y facilitar la ruptura. Tras la ruptura, los restos celulares se resuspendieron en tampón TRIS-HCl 0.1 M, pH 8.5, de este modo las bolas de vidrio decantaron y se separaron con facilidad del resto. El análisis microscópico del homogeneizado reveló la existencia de un 85% de ruptura celular tras el proceso descrito. Las paredes obtenidas se centrifugaron a 1000 rpm, 20 min y 4°C. Las paredes se lavaron 3 veces con el mismo tampón. Finalmente, se resuspendieron en un pequeño volumen de dicho tampón y se sometieron otra vez a ruptura 30 minutos más para eliminar las células intactas residuales.

Las paredes obtenidas se lavaron 15 veces con tampón y, finalmente, 3 veces con agua destilada. Las paredes se liofilizaron y se almacenaron a -20°C.

El proceso se realizó siempre en frío y con un tampón a un pH de 8.5 unidades para prevenir la acción de glucanasas endógenas liberadas durante la ruptura celular.

3.16.2.- Obtención de glucanos de la pared.

Las paredes obtenidas por el método descrito por Fleet & Phaff (1973) se sometieron en primer lugar a una extracción alcalina: 6.0 g de paredes se calentaron a 75°C durante 6 horas en una solución de NaOH al 3% (p/v), luego se enfrió la solución a 4°C y se centrifugó a 9000 rpm, 45 min, 4°C. El sobrenadante (S) (glucanos solubles en álcali) se filtró y posteriormente se neutralizó con ácido acético glacial y se dejó reposar a 4°C toda la noche. Tras este proceso se centrifugó a 9000 rpm, 45 min, 4°C. El sobrenadante (S-1) se precipitó con reactivo de Fehling para obtener el manano presente en la muestra, a dicho precipitado se le añadió HCl 3N y, a continuación, se precipitaron los mananos con una solución de

metanol/ácido acético 8:1 (v/v). El precipitado (**S-2**) resultante de la neutralización anterior se lavó con agua destilada 2 veces centrifugando cada vez a 9000 rpm, 45 min, 4°C. Por último, el precipitado obtenido se liofilizó.

De la extracción alcalina inicial, el precipitado (**P**) (glucanos insolubles en álcali) se sometió a una extracción ácida calentando a 90°C, 3 horas en ácido acético 0.5 M. Tras el proceso, se centrifugó a 9000 rpm, 45 min, 4°C. El sobrenadante (**P-1**) se dializó frente a agua y se liofilizó. El precipitado (**P-2**) se liofilizó.

La solución de Fehling, empleada habitualmente para la precipitación de mananos, está formada por dos soluciones; la primera de ellas está formada por 34.64 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ enrasando hasta 500 ml y la segunda está formada por 173 g de tartrato sódico-potásico tetrahidrato y 125 g de KOH, enrasando hasta 500 ml (Figura 3.1).

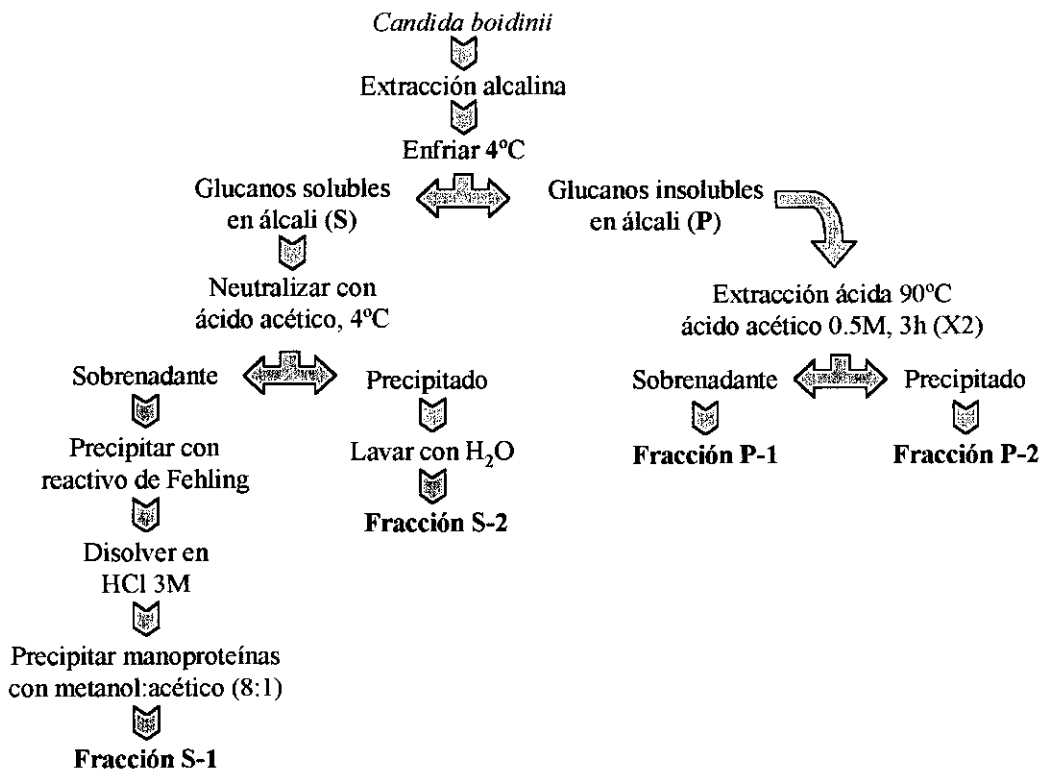


Figura 3.1.- Esquema del proceso de extracción de glucanos de la pared de *C. boidinii*.

3.16.3.- Obtención de manoproteínas.

Se siguió el método descrito por Schmitt & Radler (1987) con algunas modificaciones. Las paredes obtenidas de las células de *C. boidinii* IGC 3430 se resuspendieron en 200 ml de citrato sódico (0.02 M, pH 7.0) y se autoclavaron durante 90 minutos a 121 °C. El precipitado obtenido de centrifugar (3000 X g, 15 min, 4°C) las paredes, se resuspendió en 100 ml de la misma solución de citrato sódico y se autoclavó de la misma forma. Tras centrifugar (3000 X g, 15 min, 4°C) el *pellet* obtenido se desechó. Los dos sobrenadantes obtenidos de los dos procesos de centrifugación se juntaron y las manoproteínas presentes se precipitaron con 1.2 litros de metanol a 0°C. Las manoproteínas se decantaron por centrifugación (3000 X g, 15 min, 4°C), se resuspendieron en 100 ml de agua destilada y se dializaron frente a agua toda la noche.

Posteriormente, se realizó una precipitación con 50 ml de una solución al 8% (p/v) de bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (Cetavión=Cetrimida) dejando a 20°C en agitación toda la noche. Transcurrido dicho periodo, se centrifugó la solución (7000 rpm, 15 min, 20°C). El *pellet* formado se lavó con 50 ml de agua destilada y se centrifugó del mismo modo. Los dos sobrenadantes obtenidos se juntaron y se les añadió 100 ml de una solución de ácido bórico al 1% (p/v) y se ajustó el pH a 8.8 con NaOH 2M. Dicha solución se centrifugó (7000 rpm, 15 min, 20°C) y el precipitado obtenido se lavó con acetato sódico 0.5% (p/v), pH 8.8. Se volvió a centrifugar (7000 rpm, 15 min, 20°C) y el precipitado se disolvió en 50 ml de ácido acético al 2% (v/v).

Las manoproteínas presentes se precipitaron añadiendo 150 ml de etanol absoluto y 1 g de acetato sódico y se centrifugaron (7000 rpm, 15 min, 20°C), lavándose a continuación con una solución de ácido acético al 2% (v/v) en etanol. Dicha solución se centrifugó en las mismas condiciones y el precipitado se disolvió en agua neutralizando con NaOH 2M. Por último, se dializó frente a agua y se liofilizó. De este modo se obtuvieron manoproteínas parcialmente purificadas presentes en *Candida boidinii*. El método descrito por Schmitt & Radler, 1987 prosigue para obtener un mayor grado de pureza en las preparaciones de manoproteínas (Figura 3.2).

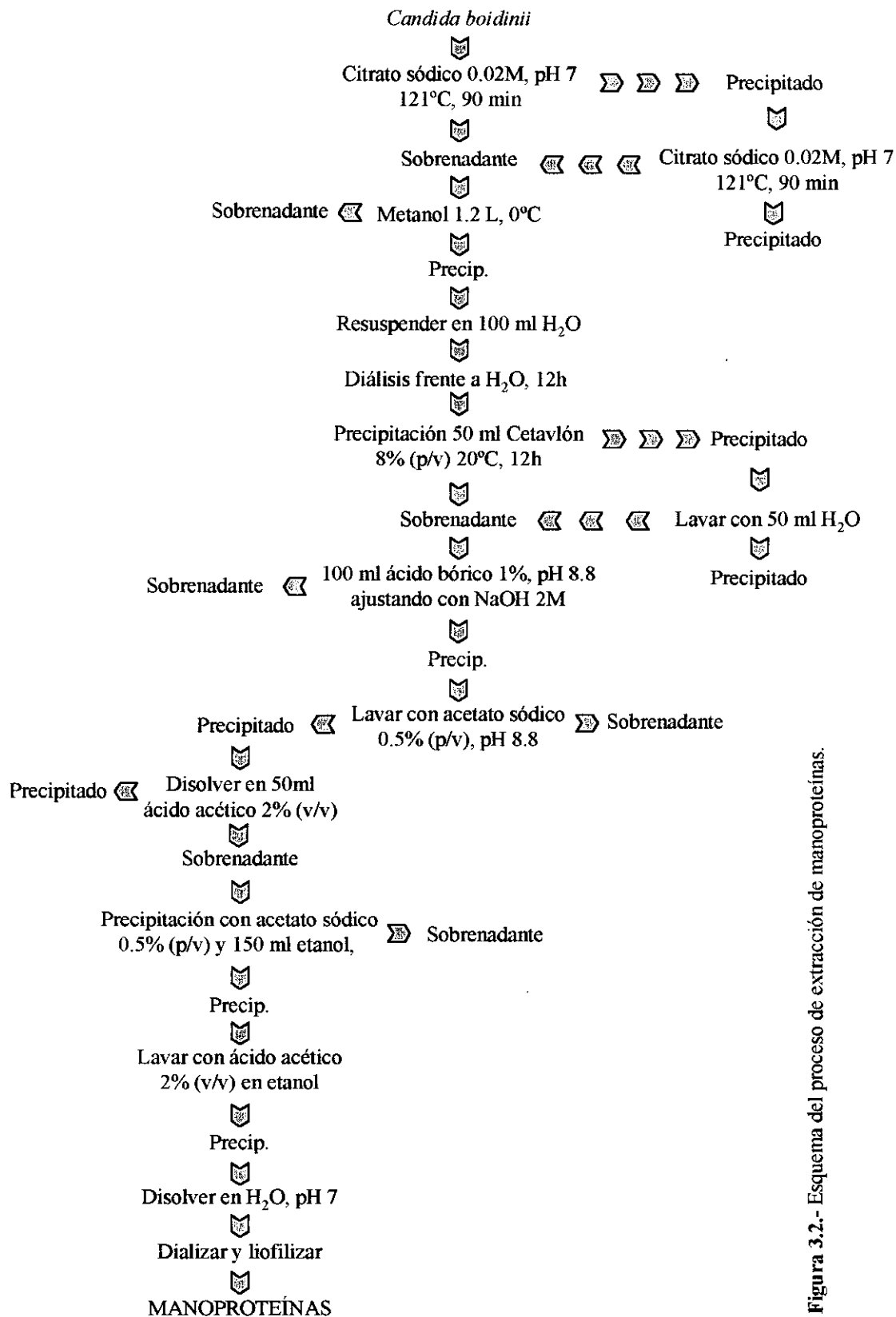


Figura 3.2.- Esquema del proceso de extracción de manoproteínas.

3.16.4.- Extracción de quitina.

La quitina de la pared de *C. boidinii* se extrajo a partir de las paredes obtenidas de cultivos en medio YMB a 30°C durante 5 días. En primer lugar se realizó una extracción con NaOH al 6% (p/v) a 75°C durante 1 hora. Tras este proceso realizado se centrifugó (5000 rpm, 10 min) y el precipitado obtenido se volvió a someter al mismo tratamiento alcalino. A continuación, se realizó una extracción con ácido acético 1M a 75°C durante 3 horas, proceso que se volvió a repetir. Con el precipitado obtenido tras centrifugar se realizó una extracción alcalina con NaOH al 3% a 75°C durante 2 horas y se centrifugó repitiendo el proceso con el precipitado obtenido. Debido a que la quitina es muy poco soluble, para eliminar las trazas de glucanos existentes se disolvió la quitina en HCl 10M a 5°C y posteriormente se neutralizó con NaOH. Tras neutralizar la quitina disuelta precipitó (Figura 3.3).

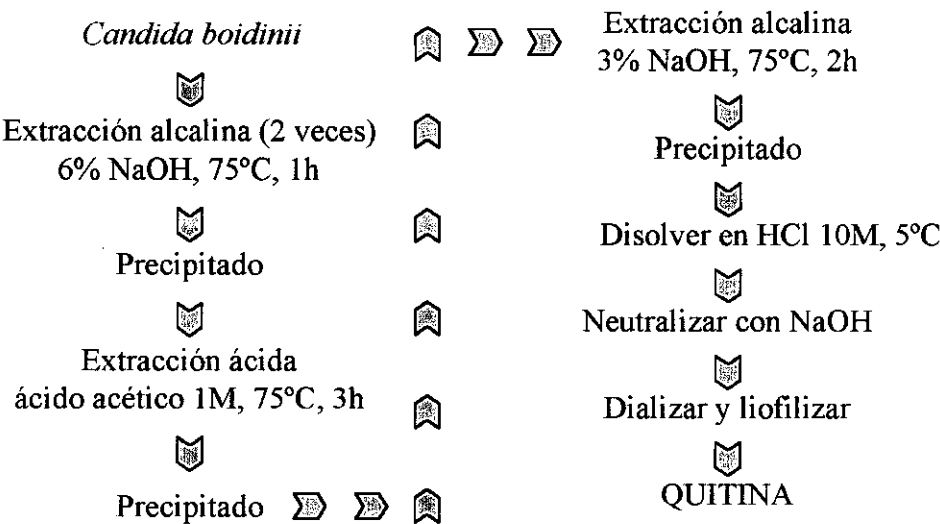


Figura 3.3.- Esquema del proceso de extracción de quitina.

3.17.- Obtención de polisacáridos de diferente naturaleza.

3.17.1.- Obtención de pustulano del liquen *Umbilicaria pustulata*.

El método que se siguió fue el descrito a continuación: 3.0 g del liquen se trituraron hasta obtener un polvo fino y a continuación, se añadieron 300 ml de H_2SO_4 0.33N, se sometió a ebullición durante 15 minutos y se dejó enfriar. Se añadió alcohol hasta alcanzar una concentración final del 13% (v/v) y se centrifugó (7000 rpm, 10 min), eliminando el precipitado oscuro resultante. El sobrenadante se llevó a una concentración del 50% (v/v) de etanol y se centrifugó, recogiendo el precipitado formado. Dicho precipitado se lavó 2 veces con acetona y se desecó.

3.17.2.- Obtención de quitina de gamba.

En primer lugar se lavaron los caparazones de gambas durante dos horas en detergente tween-80 para eliminar las partículas residuales. A continuación, se lavaron con agua por centrifugación varias veces con objeto de eliminar por completo el detergente. Se trataron con HCl 1N, agregándose éste poco a poco y con agitación hasta que dejó de desprenderse CO_2 , lo que indica la eliminación completa del carbonato que contienen los caparazones. Se lavó con agua nuevamente y se mantuvo a 100°C con NaOH 0.5N durante 30 minutos. Tras este proceso la quitina pierde casi todo el color rosado propio de las gambas. A continuación, se lavó varias veces con agua para eliminar el hidróxido sódico y se sometió a un tratamiento con MnO_4K al 0.5% (p/v) a 60°C durante 20 minutos observándose que los restos de materia orgánica se vuelven de color marrón. Para eliminar el MnO_4K se lavó con agua. Como agente de blanqueo se utilizó, a continuación, $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$ a media saturación y se lavó para eliminar los restos de este agente. Tras este proceso, se lavaron los caparazones con agua hirviendo y se extrajeron los lípidos con un tratamiento de 30 minutos con alcohol. Se lavó con agua. Por último, se trituró en omni-mixer, se centrifugó, se lavó con acetona y se dejó secar.

3.17.2.1.- Preparación de quitina coloidal.

Se añadió a 200 mg de quitina una mezcla de 5 ml de agua y 6.4 ml de H₂SO₄, agitando y en frío. Una vez disuelta la quitina, se añadió agitando 108 ml de etanol frío al 50% (v/v). La quitina precipitada se centrifugó y se lavó con agua destilada fría hasta que el pH fuera de 5.0. Después, se centrifugó de nuevo y el precipitado resultante se utilizó como *stock*, a 4°C, de quitina coloidal.

3.18.- Adsorción de la toxina a las fracciones de la pared.

Se empleó el método descrito por Radler & Schmitt (1987) con algunas modificaciones. Las diferentes fracciones purificadas de la pared se enfrentaron a extractos crudos concentrados de la toxina *killer*. Las fracciones se resuspendieron en tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0 y se enfrentaron a la toxina de *Pichia membranifaciens* (20 mg polisacárido/ml y 2383 UA/ml). Tras 1 hora de incubación a 20°C se centrifugaron y se utilizaron 40 µl para determinar la actividad *killer* residual. El diámetro de halo presente en dichos céspedes se relacionó inversamente con la cantidad de toxina adsorbida a la fracción de la pared en estudio, a mayor diámetro de halo observado, menor cantidad de toxina unida.

Como controles se utilizaron las fracciones de la pared resuspendidas en el tampón citrato-fosfato y la toxina *killer* (en igual tampón y concentración) por separado.

3.18.1.- Especificidad de la adsorción de la fracción P-1 de pared.

Para determinar la especificidad de la adsorción de la toxina *killer* a la fracción P-1 se determinó la capacidad de esta para adsorber a su estructura, en las mismas condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación que en el apartado 3.18, una solución (0.4 ml) de albúmina de suero bovino (1.5 mg ml⁻¹). Se determinó la cantidad de proteína (Bradford) existente antes y después poner en contacto la albúmina de suero bovino (BSA) con la fracción de pared (20 mg). De forma análoga, se hizo el mismo proceso empleando una solución de toxina *killer*, valorando en este caso proteínas y actividad *killer*. Las fracciones

se separaron por centrifugación a 9000 rpm, 0°C, 30 minutos, determinando en el sobrenadante la actividad *killer* y la cantidad de proteína.

3.18.2.- Especificidad de la unión de toxina a polisacáridos de diferente naturaleza.

Diferentes polisacáridos de naturaleza conocida se enfrentaron a extractos crudos concentrados de la toxina *killer* (147 UA/ml). Los polisacáridos (15 mg/ml) se resuspendieron en tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0 y se enfrentaron a la toxina de *Pichia membranifaciens*. Tras 1 hora de incubación a 20°C se centrifugaron y se emplearon 40 µl para determinar la actividad *killer* residual en el sobrenadante. Como control se utilizó la toxina *killer* (en igual tampón y concentración).

3.18.3.- Adsorción de la toxina a las fracciones tratadas con NaIO₄.

Se preparó una solución de NaIO₄ 0.1 M en tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0. A continuación se resuspendieron (2 mg) en 200 µl de este tampón las fracciones (P-1 y P-2) extraídas de la pared de la levadura sensible, así como un glucano control (pustulano). De la misma forma se resuspendieron las fracciones en el tampón en ausencia de metaperiodato. Tras 2 horas a 4°C y en oscuridad, las alíquotas se centrifugaron y se lavaron 3 veces con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0. A continuación, se resuspendieron las fracciones en 100 µl de extracto concentrado de toxina y se incubaron en agitación a 20°C durante 1 hora (concentración de las fracciones: 20 mg/ml). Tras este periodo se centrifugaron (9000 rpm, 0°C, 30 min) y se tomaron 40 µl del sobrenadante para ensayar la actividad *killer* remanente. Como control se utilizó la misma toxina empleada sin tratamiento alguno y en presencia de metaperiodato sódico 0.1 M.

3.18.4.- Velocidad de adsorción de la toxina *killer* a la fracción P-1.

Para determinar la velocidad de la adsorción de la toxina a la fracción P-1, 20 mg de esta fracción se resuspendieron en 1 ml de extracto concentrado de toxina *killer* (20°C, pH 4.0). A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras de 80 µl y se centrifugaron

(10000 rpm, 30 seg). 40 µl del sobrenadante se recogieron para determinar la actividad *killer* residual. La velocidad de adsorción se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida.

3.19.- Análisis químico de las fracciones de la pared por cromatografía gas-líquido.

3.19.1.- Hidrólisis ácida de las muestras.

La hidrólisis de las fracciones de la pared de *C. boidinii* se realizó empleando 4-5 mg de las fracciones de la pared en presencia de H₂SO₄ 2M durante un tiempo de 5 horas. Se utilizó pustulano como control en las mismas condiciones.

3.19.2.- Preparación de derivados volátiles.

Debido a su naturaleza no volátil, los productos resultantes de la hidrólisis química requieren una derivatización posterior para identificarlos por cromatografía de gases (GLC). De entre los posibles derivados, se eligieron los acetatos de alditol ya que es posible obtener un sólo derivado de cada monosacárido, lo que simplifica los cromatogramas.

Inmediatamente después de la hidrólisis se añadieron 1 mg de inositol, como estandar interno, 10 ml de agua y se neutralizó a continuación con BaCO₃. La solución se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm y se recogió el sobrenadante sobre una cápsula de porcelana para ser desecado a 60°C en una estufa de aireación. Transcurrido este tiempo se añadió en dos veces 1 ml de agua destilada para recuperar el material. Para proceder a la reducción de los monosacáridos, se pasó el material a un tubo con NaBH₄ (12-15 mg), dejándose unas 20 horas a temperatura ambiente. El exceso de borohidruro se destruyó con HCl hasta obtener un pH ácido. El siguiente paso fue la desecación del producto anterior en un rotavapor, lavando después tres veces con 2 ml de metanol. Los azúcares fueron convertidos en sus correspondientes acetatos de alditol mediante tratamiento con 1 ml de piridina: anhídrido acético (1:1) a 100°C durante 1 hora (Laine *et al.*, 1972). Estos reactivos y los derivados acetilados se disolvieron en 0.5 ml de CHCl₃ para su análisis por cromatografía de gas-líquido.

3.19.3.- Análisis de los derivados mediante cromatografía de gas-líquido (GLC).

Se empleó un equipo Perkin-Elmer, modelo Sigma 3 con detector de ionización de llama. Se utilizó una columna de vidrio de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro interno que contenía como fase estacionaria un 3% SP-2340 sobre 100/120 Supelcoport. El gas portador fue nitrógeno y su flujo de 30 ml min⁻¹. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250°C. Los distintos componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 200°C durante 3 min para luego subir a razón de 10°C por minuto hasta los 230°C, temperatura que se mantiene durante 8 min. El tiempo total del análisis fue de 14 minutos. El cromatograma resultante y el área de cada pico se recogieron en un integrador-registrador modelo Sigma 10 Perkin-Elmer.

En el cromatograma, el pico de cada azúcar se identificó comparando su tiempo de retención con los patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el área de los picos obtenidos y los factores de respuesta de cada monómero (Laine *et al.*, 1972).

3.20.- Análisis estructural de los glucanos de la pared de *C. boidinii*.

3.20.1.- Tratamiento con metaperiodato sódico.

Se resuspendieron 25 mg de cada uno de los glucanos (P-1 y P-2) en 25 ml de agua destilada y después en 25 ml de una solución de NaIO₄ 0.03 M (concentración final: 0.015 M). De estas soluciones se tomaron 20 µl y se diluyeron hasta un volumen final de 5 ml. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 223$ nm. Se realizaron mediciones hasta que la absorbancia no varió en tres días consecutivos. La disminución de la absorbancia se relacionó con la concentración de periodato consumido que, a su vez, se relaciona con la presencia de enlaces β -(1→6) en dichos glucanos. Como controles de degradación se emplearon glucosa, pustulano y, por último, periodato en ausencia de glucano alguno (Goldstein *et al.*, 1965; Hay *et al.*, 1965).

3.20.2.- Valoración de la producción de ácido fórmico.

Como resultado de la degradación producida por el metaperiodato sódico sobre los glucanos puede producirse la liberación de ácido fórmico. Esto ocurre cuando en los glucanos existen enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 6), debido a los cuales, existen en los monómeros de glucosa tres grupos hidroxilo contiguos. El metaperiodato sódico actúa en las moléculas de polisacárido allí donde existen dos grupos hidroxilos contiguos, rompiendo los monómeros de glucosa (glucanos) entre estos dos grupos. En el caso de existir tres grupos hidroxilos contiguos la oxidación produce dos roturas en el monómero glucosa produciendo la liberación de una molécula de ácido fórmico por monómero de glucosa. La determinación del ácido fórmico liberado en la oxidación da idea del porcentaje de enlaces β -(1 \rightarrow 6) en el glucano.

Se resuspendieron 25 mg de cada uno de los glucanos (P-1 y P-2) en 25 ml de agua destilada y a continuación en 25 ml de una solución de NaIO_4 0.03 M. Obteniendo así una concentración final de 0.015 M de NaIO_4 .

Se empleó una solución titulada de NaOH 0.02 M para realizar la valoración volumétrica del ácido fórmico liberado en la reacción con periodato. Se tomaron 10 ml de la solución de la reacción con periodato, se añadió 1 ml de etilenglicol para eliminar el exceso de periodato y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se determinó el ácido fórmico producido una vez el indicador de pH empleado (rojo de metilo) hubo virado.

Conociendo los datos correspondientes al consumo de NaIO_4 y a la producción de ácido fórmico obtenidos, y de acuerdo con las siguientes fórmulas, se calculó el porcentaje de cada tipo de enlace existente en cada una de las fracciones analizadas (Jeannes, A. 1965).

% Enlaces (1 \rightarrow 6): n° de moles de ácido fórmico $\times 100$

% Enlaces (1 \rightarrow 4): n° de moles de $\text{IO}_4^- \times 100 - (2 \times 100 \times n^\circ$ de moles de ácido fórmico)

% Enlaces (1 \rightarrow 3): $100 - (\% \text{ enlaces (1}\rightarrow\text{6)} + \% \text{ enlaces (1}\rightarrow\text{4)})$

3.20.3.- Espectrofotometría de infrarrojos (IR).

La naturaleza de los enlaces glicosídicos existentes entre los monómeros que forman un polisacárido, así como la presencia de sustituyentes de tipo acetamido, carboxilo o sulfato puede ser reconocida a partir de las bandas de absorción características de su espectro infrarrojo. La banda que aparece a 890 cm^{-1} indica una alta riqueza en enlaces β (Barker *et al*, 1956).

Los espectros se realizaron mediante la técnica del KBr (300 mg KBr con 1-2 mg de muestra finamente pulverizada) en un espectrofotómetro Perkin Elmer 1420 Ratio Recording Infrared Spectrophotometer.

3.20.4.- Resonancia magnética nuclear (^1H -RMN).

Una muestra de la fracción P-1 (30 mg) se resuspendió en 0.8 ml de D_2O y se centrifugó a 8000 g durante 20 minutos. Finalmente, se registraron los espectros de ^1H -RMN del sobrenadante obtenido a 300 Mhz y 35°C en un aparato Varian XL-300. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ). Como control se empleó pustulano en las mismas condiciones utilizadas. La espectroscopía de RMN tiene un conjunto de características que la hacen especialmente ventajosa para el estudio de polisacáridos. A diferencia de otros métodos físicos la espectroscopía de RMN no es destructiva. Por ello, es posible examinar un polímero sin degradarlo ni modificarlo y recuperar el material intacto. En ^1H -RMN, las señales correspondientes a los protones anoméricos están bien separadas de las producidas por la mayor parte de los otros protones. El análisis de la zona anomérica de los espectros de ^1H -RMN indica el grado de complejidad del polímero, pudiéndose determinar el número de residuos diferentes en el polisacárido y sus proporciones relativas. Cada protón anomérico da una señal, que la mayor parte de las veces se desdobra debido a la constante de acoplamiento, la cual varía según la configuración anomérica.

3.21.- Obtención de protoplastos de *C. boidinii* IGC 3430.

Para la obtención de esferoplastos la levadura sensible se creció en medio YMB a 20°C. La cantidad de células utilizada para la obtención de los protoplastos fue 10^7 células. Dichas células se lavaron con agua estéril y se incubaron en 5 ml de una solución 5 mM de EDTA, 2.5% (v/v) β -mercaptoetanol durante 10 minutos. Las células así tratadas se centrifugaron y se incubaron con agitación suave a 30°C, resuspendidas en 3 ml de tampón fosfato de Sørensen 50 mM, pH 7.5 con 0.6 M KCl, 20 mM β -mercaptoetanol, 50 mM EDTA y 60 mg de *Novoenzym*, un complejo con diferentes actividades hidrolíticas obtenido de *Trichoderma harzianum*. El tiempo optimizado para la obtención de los protoplastos fue de 2.5 horas. Posteriormente, para retirar el complejo enzimático, los protoplastos se centrifugaron a 800 g durante 2 min y se volvieron a resuspender en medio B (50mM CaCl_2 , 0.6 M KCl, pH 4.5) en presencia de toxina activa y desnaturalizada por calor. A las 8 horas de incubación (20°C, agitación suave) se tomaron muestras de los protoplastos, se realizaron bancos de diluciones en medio B y se sembraron en un medio sólido de regeneración de protoplastos para hacer un recuento de los protoplastos supervivientes. La incubación en este medio se realizó a 30°C hasta la aparición de colonias. La composición del medio de regeneración de esferoplastos fue la siguiente: Glucosa 20 g/l, Peptona 20 g/l, Extracto de levadura 10 g/l, KCl 44.73 g/l (0.6 M), Agar 12 g/l. (Schmitt & Radler, 1988).

3.22.- Cinética de muerte celular por acción de la toxina *killer*.

La muerte celular debida a la acción de la toxina *killer* se determinó por recuento de viables (unidades formadoras de colonias "UFC"). 2×10^6 células/ml de la levadura sensible crecidas previamente a 20°C en YMB tamponado (citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0, 6% NaCl), se centrifugaron y resuspendieron en presencia de toxina *killer* activa (1205 UA/ml) e inactivada por calor (toxina resuspendida en medio YMB tamponado pH 4.0, 6% NaCl). Las muestras se tomaron cada hora, se diluyeron convenientemente (banco de diluciones) y se sembraron en medio YMA. Al cabo de 48 horas a 30°C se realizó el recuento del número de colonias existentes.

3.23.- Determinación de la integridad de la membrana celular por citometría de flujo.

Se preparó una solución stock de ioduro de propidio (IP) en agua destilada a una concentración de 0.05 mg/ml. Esta solución fue la utilizada para obtener una concentración final en las muestras analizadas en el citómetro de flujo de 5 µg/ml.

Se preparó un cultivo a 20°C de *C. boidinii* IGC 3430, la cepa empleada como sensible a la toxina, en medio YMB tamponado con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0, con un 6% (p/v) de NaCl. Cuando el cultivo se encontró en fase exponencial de crecimiento se tomaron las células del mismo, estas se resuspendieron en una solución de toxina *killer* activa y en presencia de toxina inactivada por calor (75°C, 5 min), (ambas soluciones de toxina resuspendidas en el mismo medio de cultivo antes descrito). La temperatura de incubación fue de 20°C con una agitación de 125 rpm, la concentración celular empleada fue de 10⁶ células/ml y la actividad de la toxina de 1205 UA/ml. Se tomaron muestras de 0.5 ml a diferentes intervalos de tiempo, se añadieron 50 µl de la solución stock de ioduro de propidio y a continuación, tras una incubación de 1 minuto, se analizaron en el citómetro de flujo.

El ioduro de propidio es un compuesto que por su naturaleza no puede penetrar en la membrana celular de las levaduras. Por esta razón es posible emplear dicho fluoróforo como indicador de la integridad de la membrana celular. Sólo cuando la membrana se encuentra dañada el ioduro de propidio es capaz de penetrar en la célula. Una vez dentro de esta el fluoróforo interacciona con los ácidos nucleicos (ADN y ARN) de doble cadena, siendo fluorescente ($\lambda_{\text{emisión}} = 639 \text{ nm}$) cuando es excitado a longitudes de onda cercanas a 495 nm y 342 nm.

El citómetro de flujo empleado fue un FACS-scan de Becton Dickinson. El número de células analizadas fue de 10000 en cada muestra. El tampón empleado para establecer el flujo en el cual iban las células fue tampón fosfato salino (PBS) de Becton Dickinson.

En las células existen diferentes componentes que pueden poseer la capacidad de ser fluorescentes. Por esta razón, en los ensayos se utilizaron como control de fluorescencia

(fluorescencia intrínseca) células en ausencia de yoduro de propidio. Para determinar la emisión de fluorescencia (en presencia de IP) de células permeabilizadas se emplearon células permeabilizadas con etanol al 70% (v/v) y con calor.

3.24.- Determinación del pH intracelular.

En primer lugar se realizó un pre-inóculo de la levadura sensible en YMB + 6% NaCl en tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0, 20°C, 150 rpm. A partir del pre-inóculo se inoculó un matraz de 50 ml con 10 ml del mismo medio suplementado con SNARF-1 (seminafiorodafuor-1, Molecular Probes) a una concentración de 5 μ M (Musgrove *et al.*, 1986; Buckler & Vaughan-Jones, 1990; Martínez-Zaguilán *et al.*, 1991; Seksek *et al.*, 1991; Wieder *et al.*, 1993; Boyer & Hedley, 1994). Se incubó en oscuridad a 20°C, 150 rpm. A las 12 horas, estando las células en fase exponencial de crecimiento, a partir del matraz con SNARF-1 se inocularon 2 matraces, uno con toxina activa (1205 UA/ml) y otro con toxina inactivada ambos en medio YMB + 6% NaCl + SNARF-1 (5 μ M), pH 4.0, V=10 ml, hasta obtener un número de células aproximado de 10^6 células/ml (haciendo un recuento al microscopio de contraste de fase). Se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos (0h, 1h, 2h...) y se analizaron en el citómetro de flujo. La relación de fluorescencia (FL3/FL1) emitida por las células es reflejo del pH intracelular de las células.

Para correlacionar la fluorescencia emitida (FL3/FL1) con el pH_i fue necesario obtener una recta patrón. Se prepararon tampones (citrato/fosfato 100 mM, 6% (p/v) NaCl, 150 mM KCl) con valores de pH entre 3.0 y 7.5 a intervalos de 0.5 unidades de pH. En primer lugar, se realizó un pre-inóculo inoculando la levadura sensible (*C. boidinii*) en YMB + 6% NaCl, en tampón citrato fosfato 10 mM, pH 4.0, 20°C, 150 rpm. A partir del pre-inóculo se sembró un matraz de 50 ml con 10 ml del mismo medio suplementado con SNARF-1 (5 μ M). Se incubó en oscuridad a 20°C, 150 rpm durante 12h. A las 12h las células, en fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron y se resuspendieron en los diferentes tampones (3.0 a 7.5) hasta una concentración de 10^6 células/ml. Se tomó 1 ml de cada una de las suspensiones celulares y se añadieron 10 μ l de un stock de nigericina (100 μ M), (concentración final 1 μ M). Se incubó 30 segundos y se analizaron en el citómetro de flujo.

3.25.- Determinación de K⁺ y Na⁺ por fotometría de llama.

La fotometría de llama se basa en la medida de la emisión característica de átomos previamente excitados en una llama. En el fotómetro de llama la muestra en disolución se introduce en forma de aerosol en la llama. Las gotas de aerosol se forman mediante un sistema de nebulización y son arrastradas por el gas combustible hacia la región de combustión. Cuando los átomos en estado elemental son excitados a un nivel energético superior vuelven a su estado energético original con emisión de energía en forma de una radiación electromagnética definida, y como la intensidad de emisión se encuentra relacionada con el número de átomos que han sido excitados, su medida constituye la base de la determinación cuantitativa.

3.25.1.- Determinación de K⁺ extracelular.

A partir de un cultivo, incubado a 20°C, se obtuvo un preinóculo de células en fase exponencial de crecimiento de la cepa sensible *C. boidinii*. Estas células se inocularon en YMB con un 6% (p/v) NaCl y un 0.05% (p/v) KCl, pH 4.0 (tampón citrato-fosfato 10 mM) durante 12h. Las células crecidas se centrifugaron (5000 rpm, 2 min, 20°C) y lavaron (con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0), y a continuación, se resuspendieron y se incubaron en presencia de toxina (activa (1205 UA/ml) e inactivada), en agitación orbital y a una temperatura de 20°C. La toxina empleada fue resuspendida previamente en YMB, con un 6% (p/v) de NaCl, tamponado con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0. La concentración celular ensayada fue aproximadamente de 10⁶ células/ml.

Las células se incubaron a 20°C y se tomaron muestras de 2 ml a lo largo del tiempo. Las muestras se filtraron (con filtros de 0.45 µm) y las muestras se analizaron en espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 3100. La longitud de onda de emisión del potasio es $\lambda_{K^+}=766.5$ nm. El sistema de nebulización empleado fue la bola de impacto. La llama empleada fue una llama de aire-acetileno oxidante; a un flujo de acetileno de 2 litros min⁻¹ y a un flujo de aire de 16 litros min⁻¹.

Se relacionó la señal proporcionada por el aparato con la concentración de K^+ empleando una recta patrón realizada con concentraciones crecientes de KCl.

3.25.2.- Determinación de Na^+ intracelular.

Se realizó de la misma forma que en el caso anterior (apartado 3.25.1) cambiando la longitud de onda en el espectrofotómetro de absorción atómica, ya que el sodio emite en una longitud de onda diferente (λ_{Na+} 589). Análogamente, se realizó una recta patrón que relacionara la concentración de Na^+ y la señal del espectrofotómetro.

3.26.- Determinación del contenido en DNA por citometría de flujo.

Para cuantificar la cantidad de DNA, en función de la emisión de fluorescencia de las células marcadas con ioduro de propidio, se siguió el procedimiento detallado a continuación:

A partir de un cultivo incubado a 20°C se obtuvieron células en fase exponencial de crecimiento de la cepa sensible *C. boidinii*. Aproximadamente 10^6 células/ml se incubaron en presencia de toxina (activa (1205 UA/ml) e inactivada) resuspendida en YMB con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 4.0, con un 6% (p/v) de NaCl, en agitación y a una temperatura de 20°C. Las muestras (200 μ l) tomadas a lo largo del tiempo se centrifugaron y se resuspendieron lentamente en etanol al 70% (v/v) a -20°C durante 15 minutos para su permeabilización. El etanol se eliminó centrifugando y lavando con PBS (tampón fosfato salino). Posteriormente, las células se resuspendieron en una solución de ribonucleasa A (Sigma) preparada a una concentración de 1 mg/ml en tampón Tris-HCl, pH 6.8. Dicha ribonucleasa se hirvió durante 15 minutos para eliminar la desoxirribonucleasa contaminante en dicha preparación. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas para eliminar el RNA presente en las células. A continuación, las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de una solución de ioduro de propidio (0.05 mg/ml) en PBS a 4°C durante 30 minutos. Seguidamente se analizaron en el citómetro de flujo analizando 10000 células por muestra.

3.27.- Ubicación de la información genética que codifica la toxina *killer*. Experiencias de curación del carácter *killer*.

3.27.1.- Curación (eliminación) del factor *killer*.

La existencia de cepas *killer* cuyas informaciones genéticas, para la codificación de las toxinas que producen, están ubicadas en plásmidos, permite la obtención de cepas "curadas", es decir, sin el carácter *killer*, simplemente tratando las células con diferentes agentes físico-químicos.

Se han empleado tres tratamientos diferentes para la eliminación "curación" de plásmidos de las células de *P. membranifaciens* CYC 1106. La cepa se incubó en YMA en presencia de diferentes concentraciones de cicloheximida (0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml y 1 mg/ml), también se incubó a temperaturas de 32, 34 y 37°C y fue tratada con luz UV (30 segundos). Tras la realización de cada uno de los tratamientos las colonias aparecidas (tras 2-15 días) se sembraron en medio YMA-MB en cuya superficie se había realizado un cespel de la levadura sensible. Tras el crecimiento del cespel a 20°C se determinó el número de cepas aparecidas que habían perdido o no su carácter *killer* (Wickner, R.B. 1974; Weinstein *et al.*, 1996).

3.27.2.- Extracción de DNA y RNA.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó en primer lugar lisando los protoplastos obtenidos a partir de células de *P. membranifaciens* CYC 1106 (Gunge *et al.*, 1981). Los protoplastos se lisaron en presencia de SDS 0.5 ml al 10% y posteriormente se añadió NaCl para alcanzar una concentración final de 1 M. Se dejó en hielo toda la noche y se centrifugó. El sobrenadante se precipitó con dos volúmenes de etanol (-20°C) y un volumen de acetato sódico 3M. Se incubó 2h a -20°C. Se centrifugó y se recogió el precipitado. Este precipitado se disolvió en 100 µl de tampón TES (Tris-HCl 30 mM, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, Sarcosina 0.4 %). Se añadió ribonucleasa hervida (en el aislamiento del ADN) a una concentración final de 50 µg/ml y se incubó 30 minutos a 37°C.

Para el aislamiento del RNA el proceso fue similar pero incubando en presencia de desoxirribonucleasa (20 µg/ml) para eliminar el DNA. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1%.

3.27.2.1.- Electroforesis de ácidos nucleicos.

Las muestras de DNA y RNA en agua se resuspendieron en tampón BS (Azul de bromofenol-sacarosa (50%)) y se aplicaron en geles de agarosa del 1%. Los geles de agarosa estaban formados por agarosa (1%), tampón TBE (0.5X) (Tris-borato 450 mM, EDTA 10 mM) hasta 40 ml y 3 µl de bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 80 voltios durante 1.5 horas. Tras el proceso se fotografiaron en transiluminador de luz ultravioleta. Como patrón se emplearon 10 µl de patrón λ-Hind (250 ng/ml).

IV.- RESULTADOS

4.1.- Determinación de la actividad *killer*.

La actividad *killer* se determinó por el método de difusión en placa descrito en el apartado 3.6. El diámetro de los halos de inhibición se relacionó con la actividad *killer*. Como resultado se observó una relación lineal entre el logaritmo de la actividad *killer* y el diámetro de halo observado (Figura 4.1), de forma similar a lo que sucede al determinar la actividad de antibióticos por este método (Ohta *et al.*, 1984).

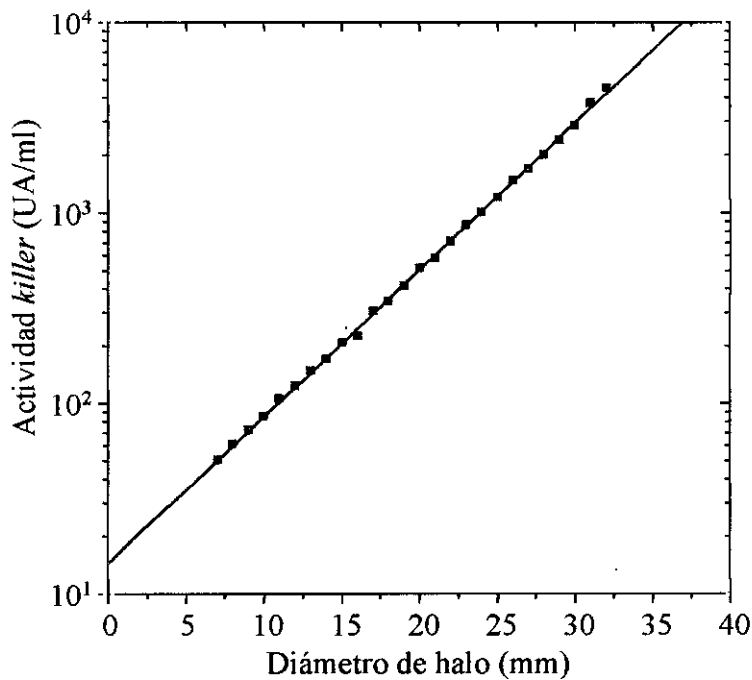


Figura 4.1.- Relación entre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento y la actividad *killer* expresada en unidades arbitrarias.

4.2.- Cinética de la producción de toxina *killer*.

Los resultados obtenidos del crecimiento de *P. membranifaciens*, determinados por densidad óptica, en los medios de cultivo seleccionados (YMB e YNB), muestran que dicha cepa presentó una tasa de crecimiento superior (41.8%) en el medio complejo (YMB) 0.308 h^{-1} , frente a las 0.179 h^{-1} que presentó en el medio YNB. Determinando la actividad de la toxina a lo largo del crecimiento se observó como la producción de toxina *killer* por *P.*

membranifaciens tiene lugar cuando la levadura está creciendo de forma exponencial, y llega a su término aproximadamente al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, produciéndose desde ese momento una pérdida progresiva de la actividad (Figura 4.2).

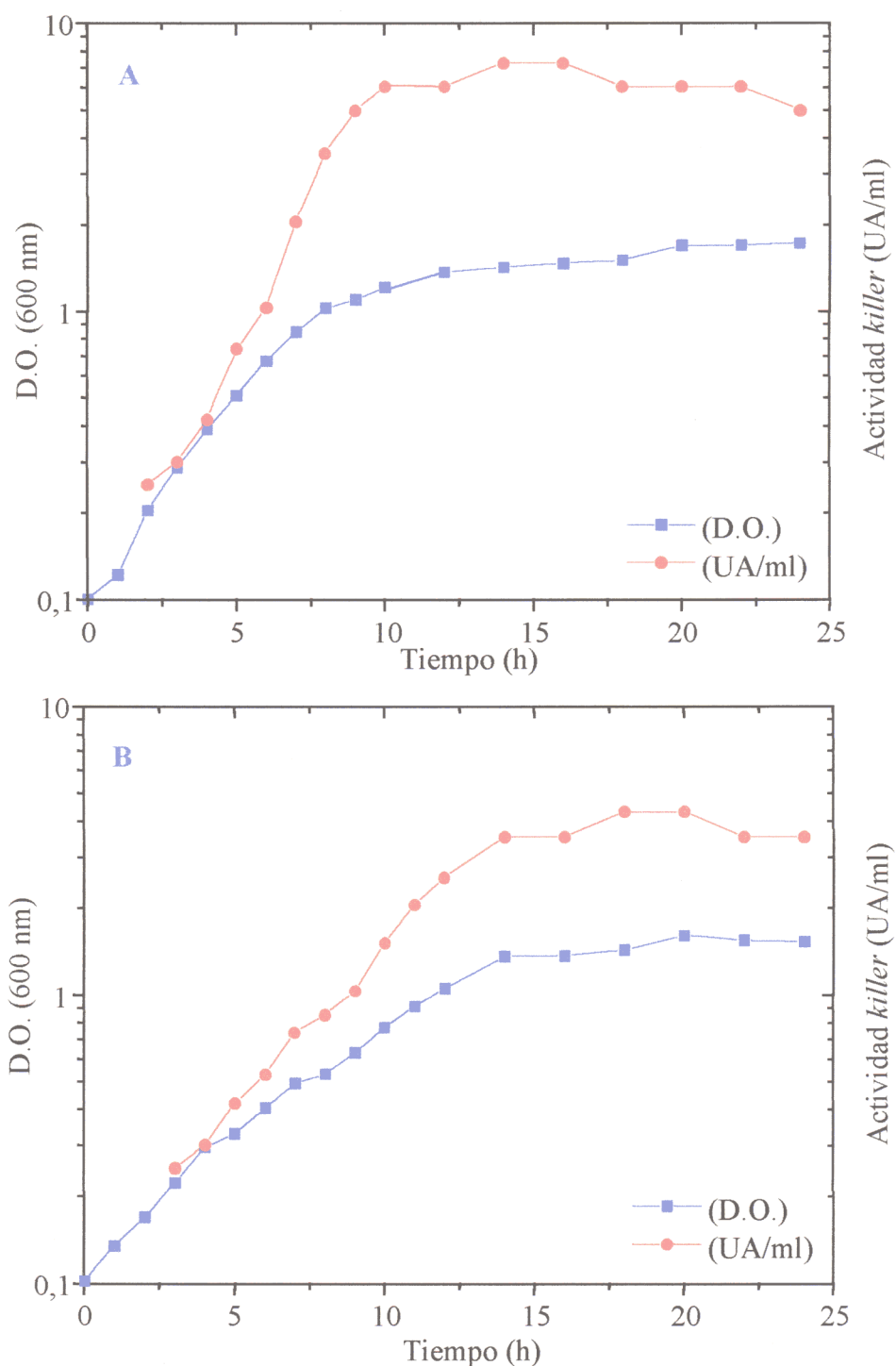


Figura 4.2.- Cinética de crecimiento y producción de toxina *killer* en los medios de cultivo YMB (A) e YNB (B).

4.3.- Estudio sobre la mejora de la producción de toxina *killer*.**4.3.1.- Determinación de la producción de toxina en distintos medios de cultivo.**

Se estudiaron diferentes medios de cultivo utilizados habitualmente para el desarrollo de levaduras. Entre estos medios se seleccionaron tanto medios complejos (YMB, YPD y Gorodkova) como definidos (YNB y Medio K). Los resultados mostraron como el medio YMB fue el que presentó una mayor actividad *killer*, sin embargo, el medio YNB, uno de los medios definidos, presentó una mayor actividad específica, razón por la cual fue seleccionado para realizar un estudio más exhaustivo para la mejora de la producción de toxina *killer* en los cultivos (Tabla 4.1).

Medio de cultivo	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso seco (mg ml ⁻¹)	Proteínas (µg ml ⁻¹)	Actividad <i>killer</i> (UA ml ⁻¹)	Actividad específica (UA mg ⁻¹)
YMB	0.308	1.101	43.66	5.250	120.2
YPD	0.291	1.013	81.32	4.250	52.3
Gorodkova*	0.204	0.985	51.59	3.680	71.3
YNB	0.179	1.012	3.01	2.500	830.5
K	0.148	1.067	4.30	1.250	290.7

Tabla 4.1.- Crecimiento y producción de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* en distintos medios de cultivo. (*) Medio de Gorodkova modificado según se describe en el correspondiente apartado de Material y Métodos.

4.3.2.- Mejora de la producción en el medio *Yeast Nitrogen Base*.

Entre los medios generales empleados para la producción de toxina *killer* el medio YNB fue el que presentó una mayor actividad específica, procediéndose a su optimización incorporando a este diferentes aditivos y realizando el cultivo en diferentes condiciones. Como conclusión de los resultados que se muestran a continuación (Tablas 4.2, 4.3, 4.4; Figuras 4.3, 4.4 y 4.5) se pudo deducir que las condiciones de cultivo (pH, temperatura y agitación)

influyen de manera sustancial en la producción de toxina *killer*. Los valores de pH superiores a 5.0 no permitieron obtener actividad en los sobrenadantes de los cultivos, indicando una ausencia de producción o una inactivación de la toxina a estos valores de pH. Los valores de pH cercanos a 4.0 fueron los más idóneos para la obtención de actividad.

pH del medio de cultivo	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso seco (mg ml ⁻¹)	Proteínas (µg ml ⁻¹)	Actividad <i>Killer</i> (UA ml ⁻¹)	Actividad específica (UA mg ⁻¹)
3.0	0.159	1.22	3.38	2.125	628.7
3.5	0.171	1.20	3.45	2.125	615.9
4.0	0.182	1.18	3.09	2.500	809.1
4.5	0.194	1.10	3.26	2.500	766.8
5.0	0.201	1.11	3.50	2.125	607.1
5.5	0.195	0.81	4.00	1.250	312.5
6.0	0.173	0.81	3.31	0	0

Tabla 4.2.- Crecimiento y producción de toxina en función del pH del medio de cultivo (YNB).

De forma similar al pH los valores más elevados de temperatura causaron una pérdida en la actividad *killer*. Los cultivos incubados a la temperatura más baja de las ensayadas (20°C) fueron los que produjeron una actividad mayor (Tabla 4.3). Los ensayos realizados a diferentes velocidades de agitación mostraron que una agitación lenta es la más adecuada para la obtención de actividad *killer* (150 rpm) (Tabla 4.4).

Temperatura incubación (°C)	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso seco (mg ml ⁻¹)	Proteínas (µg ml ⁻¹)	Actividad <i>Killer</i> (UA ml ⁻¹)	Actividad específica (UA mg ⁻¹)
20	0.191	1.00	3.01	2.500	830.5
25	0.239	0.99	3.15	2.125	674.6
30	0.291	1.01	4.21	0	0

Tabla 4.3.- Crecimiento y producción de toxina *killer* en función de la temperatura de cultivo.

Agitación (rpm)	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso seco (mg ml ⁻¹)	Proteínas (μg ml ⁻¹)	Actividad <i>Killer</i> (UA ml ⁻¹)	Actividad específica (UA mg ⁻¹)
100	0.175	1.01	3.44	2.500	644.3
150	0.183	0.91	3.10	2.500	806.5
200	0.181	0.94	3.44	2.125	617.7
250	0.181	0.97	3.96	2.125	536.6

Tabla 4.4.- Crecimiento y producción de toxina *killer* en función de la velocidad de agitación del cultivo.

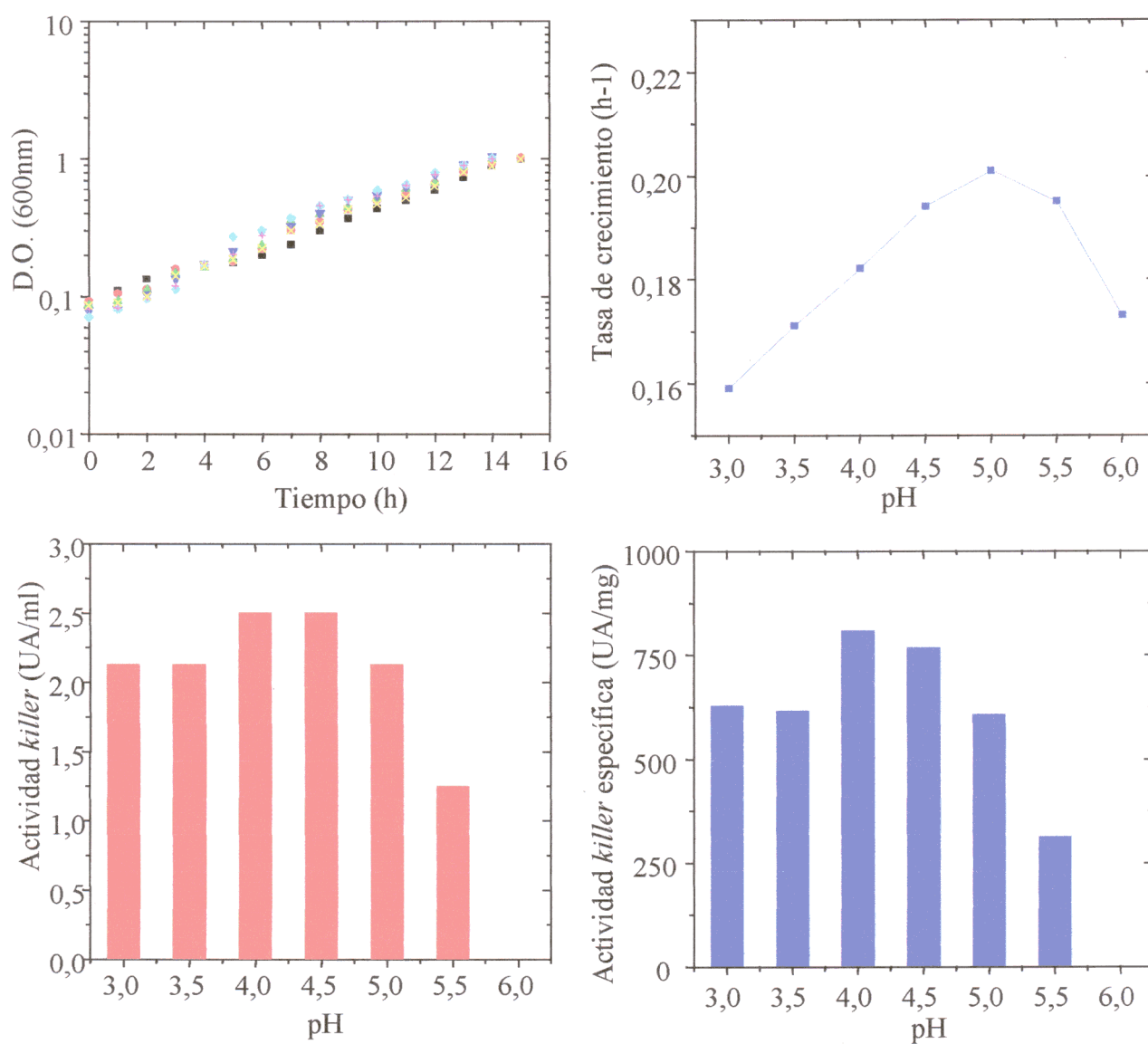


Figura 4.3.- Crecimiento y producción de toxina *killer* en función del pH del medio YNB. Valores de pH: 3.0 (■), 3.5 (●), 4.0 (▲), 4.5 (▼), 5.0 (◆), 5.5 (✦) y 6.0 (✕).

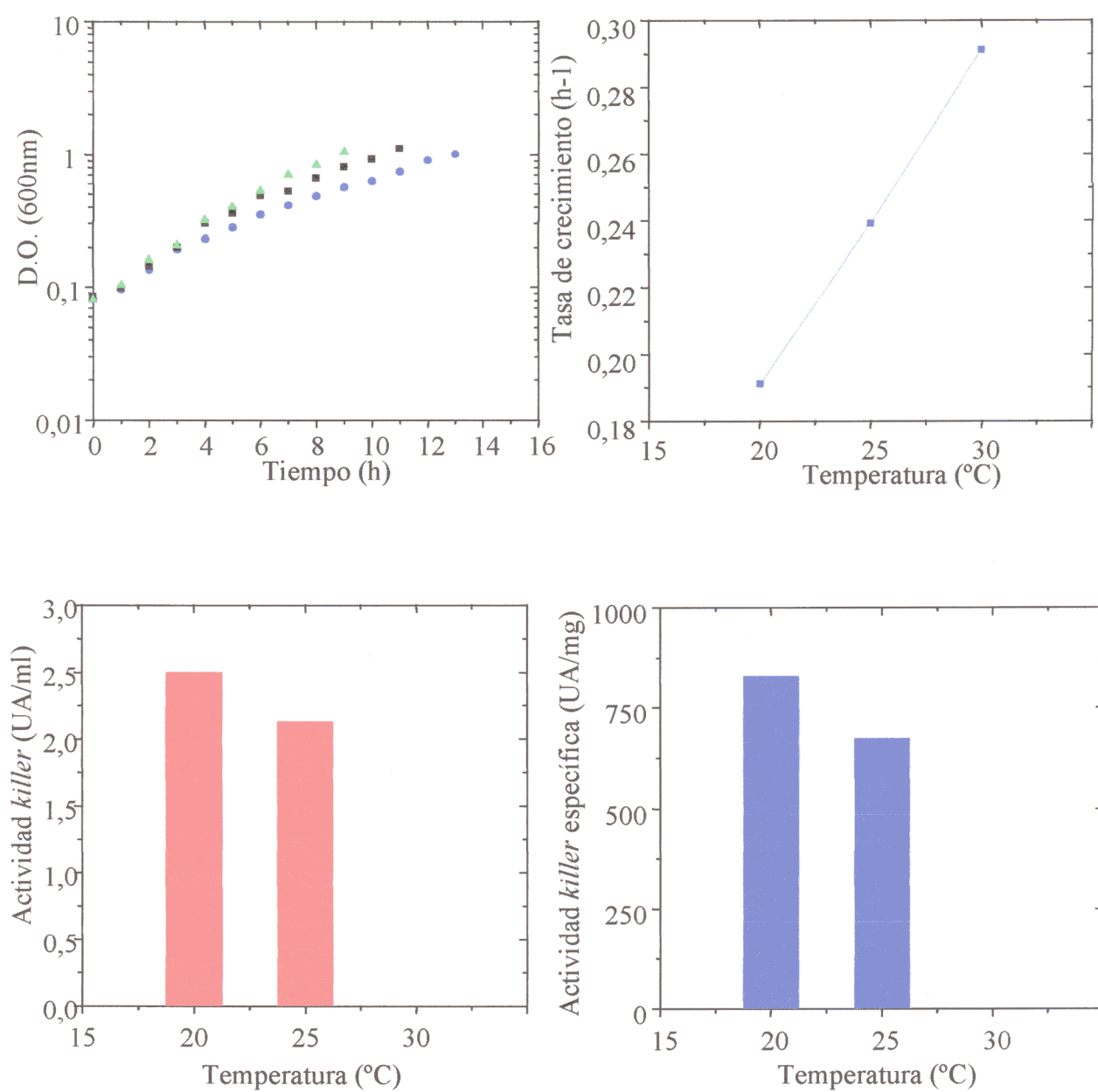


Figura 4.4.- Crecimiento y producción de toxina *killer* en medio YNB en presencia de diferentes temperaturas de incubación. Temperaturas: 20 (●), 25 (■) y 30°C (▲).

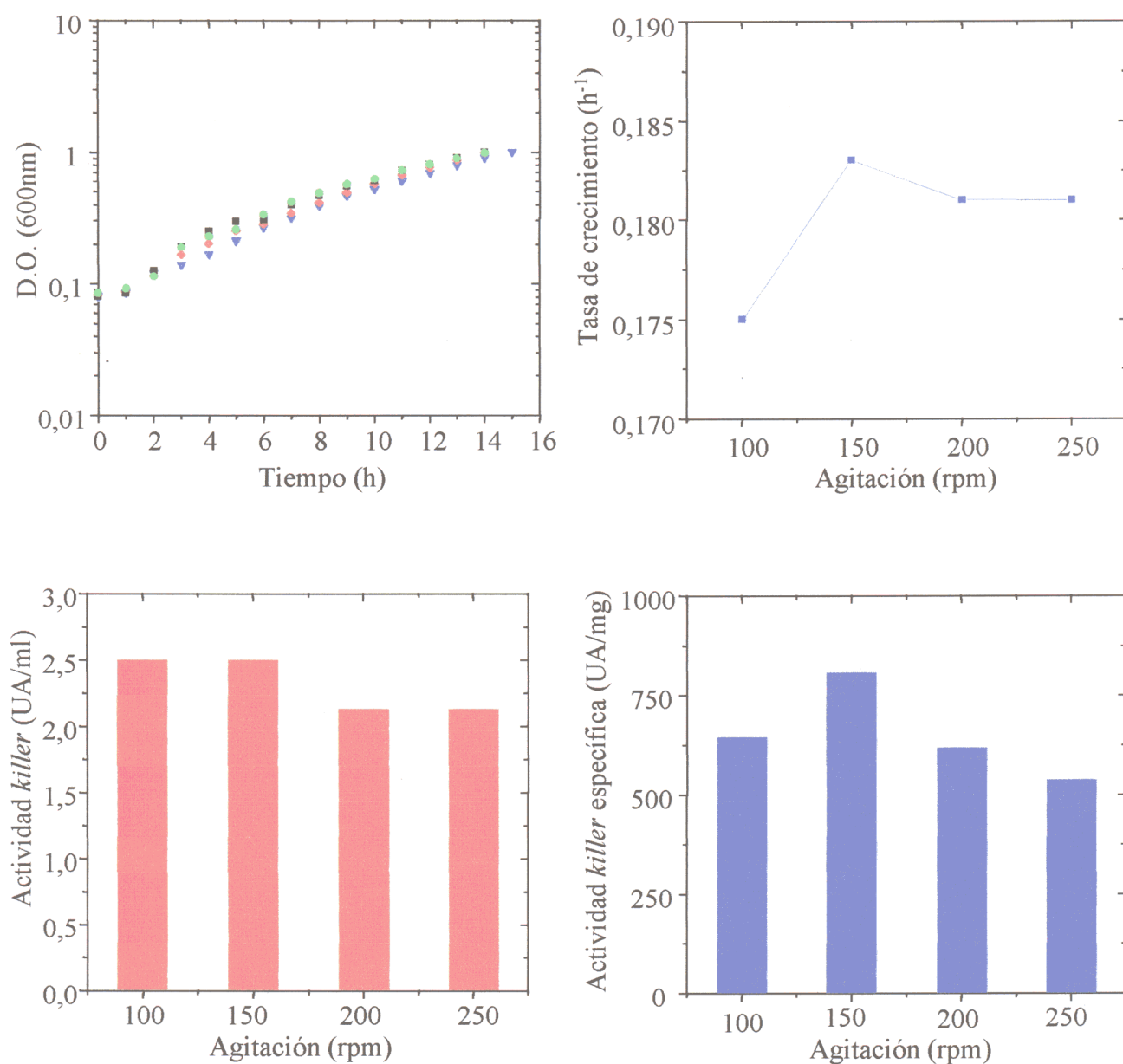


Figura 4.5.- Crecimiento y producción de toxina *killer* en medio YNB en función de la velocidad de agitación. Agitación: (▼) 100, (♦) 150, (■) 200, (●) 250 rpm.

La mejora de la producción incorporando diferentes aditivos al medio base YNB aportó resultados satisfactorios; fundamentalmente en lo que respecta a la incorporación de detergentes de diferente naturaleza al medio. Todos los detergentes empleados mejoraron de forma significativa la actividad detectada en el medio de cultivo. Dos detergentes, Triton X-100 y Brij 58, proporcionaron las actividades específicas mayores. 0.1% (p/v) de Triton X-100 incorporado al medio de cultivo produjo una actividad específica de 2174 UA mg⁻¹ incrementando la actividad producida en el medio base en un 262%. Este aumento en la producción fue aun mayor en el caso del detergente Brij 58 que a una concentración de 0.01% incrementó la actividad específica a 2914.5 UA mg⁻¹, un 351% más que la proporcionada por el medio base sin aditivos (Tablas 4.5a y 4.5b).

Aditivos	(%) (p/v)	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso seco (mg ml ⁻¹)	Proteínas (µg ml ⁻¹)	Actividad <i>killer</i> (UA ml ⁻¹)	Actividad específica (UA mg ⁻¹)
Triton X-100	0.001	0.171	0.87	1.87	2.500	1337.0
Triton X-100	0.01	0.157	0.93	4.97	7.400	1448.0
Triton X-100	0.1	0.160	1.08	6.90	15.000	2174.0
Tween 80	0.001	0.162	0.94	4.03	2.500	620.3
Tween 80	0.01	0.168	0.87	3.47	4.250	1224.5
Tween 80	0.1	0.162	0.82	4.42	5.250	1188.0
Brij 58	0.001	0.172	0.92	2.97	2.500	842.0
Brij 58	0.01	0.172	0.86	3.86	11.250	2914.5
Brij 58	0.1	0.165	1.01	5.65	15.000	2655.0
Plurónico F-127	0.001	0.190	0.99	2.16	2.500	1157.4
Plurónico F-127	0.01	0.207	0.95	3.16	3.680	1164.5
Plurónico F-127	0.1	0.186	0.99	4.42	5.250	1187.7
SDS	0.001	0.144	0.92	2.42	0	0
SDS	0.01	0	0	0	0	0
SDS	0.1	0	0	0	0	0

Tabla 4.5a.- Crecimiento y producción de toxina en función de los aditivos incorporados al medio de cultivo (YNB).
SDS: dodecil sulfato sódico.

Aditivos	(%) (p/v)	Tasa de crecimiento (h⁻¹)	Peso seco (mg ml⁻¹)	Proteínas (µg ml⁻¹)	Actividad <i>Killer</i> (UA ml⁻¹)	Actividad específica (UA mg⁻¹)
PEG-400	0.001	0.210	1.01	3.35	2.500	746.3
PEG-400	0.01	0.211	1.02	3.85	3.680	955.8
PEG-400	0.1	0.197	0.92	5.20	1.250	240.3
PEG-1500	0.001	0.202	1.16	3.45	2.500	724.6
PEG-1500	0.01	0.200	1.16	4.10	2.125	518.3
PEG-1500	0.1	0.191	0.83	2.95	2.125	720.3
PEG-6000	0.001	0.198	0.81	3.09	2.125	687.7
PEG-6000	0.01	0.214	1.15	3.45	3.680	1068.0
PEG-6000	0.1	0.193	0.78	3.65	2.125	582.2
Glicerol	1	0.205	0.98	4.10	2.125	518.3
Glicerol	5	0.212	0.96	4.13	2.125	514.5
Glicerol	10	0.198	0.85	5.19	2.125	409.4
Sorbitol	1	0.208	0.88	5.01	2.500	499.0
Sorbitol	5	0.204	0.96	4.85	2.125	438.1
Sorbitol	10	0.181	1.06	4.36	2.500	573.4
Urea	1	0.196	0.91	4.18	2.125	508.3
Urea	2	0.185	1.01	4.80	2.125	442.7
Urea	3	0.187	1.0	4.66	2.125	456.0
PMSF	0.001	0.189	0.99	3.22	2.125	659.9
PMSF	0.01	0.190	0.95	3.82	2.500	654.4
PMSF	0.1	0	0	0	0	0

Tabla 4.5b.- Optimización de la producción de toxina *killer*. PEG: Polietilenglicol. PMSF: *Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluoride*.

4.4.- Propiedades de actividad y estabilidad de la toxina *killer*.

4.4.1.- Temperatura óptima de actividad.

La actividad de la toxina *killer* fue máxima a temperaturas inferiores a 20°C, por encima de este valor de temperatura la toxina presentó una pérdida considerable de actividad (Figura 4.6).

4.4.2.- Estabilidad de la toxina a la temperatura.

La estabilidad de la toxina a la temperatura se realizó a temperaturas desde 5 a 35°C durante 7 días como se muestra en la figura 4.6 (A). La estabilidad fue del 100% a temperaturas inferiores a 25°C, a 25°C la estabilidad de la toxina *killer* disminuyó un 40% al cabo de los 7 días. Por encima de esta temperatura la estabilidad disminuyó de forma drástica.

4.4.3.- pH óptimo de actividad.

Los valores óptimos de pH para la actividad de la toxina fueron aquellos valores de pH inferiores a 4.5 unidades según se muestra en la figura 4.7.

4.4.4.- Estabilidad de la toxina al pH.

Como se observa en la figura 4.7 la toxina fue estable a valores de pH sensiblemente ácidos. La toxina se mostró 100% activa para valores de pH inferiores a 4.8, por encima de este valor de pH la estabilidad disminuyó rápidamente.

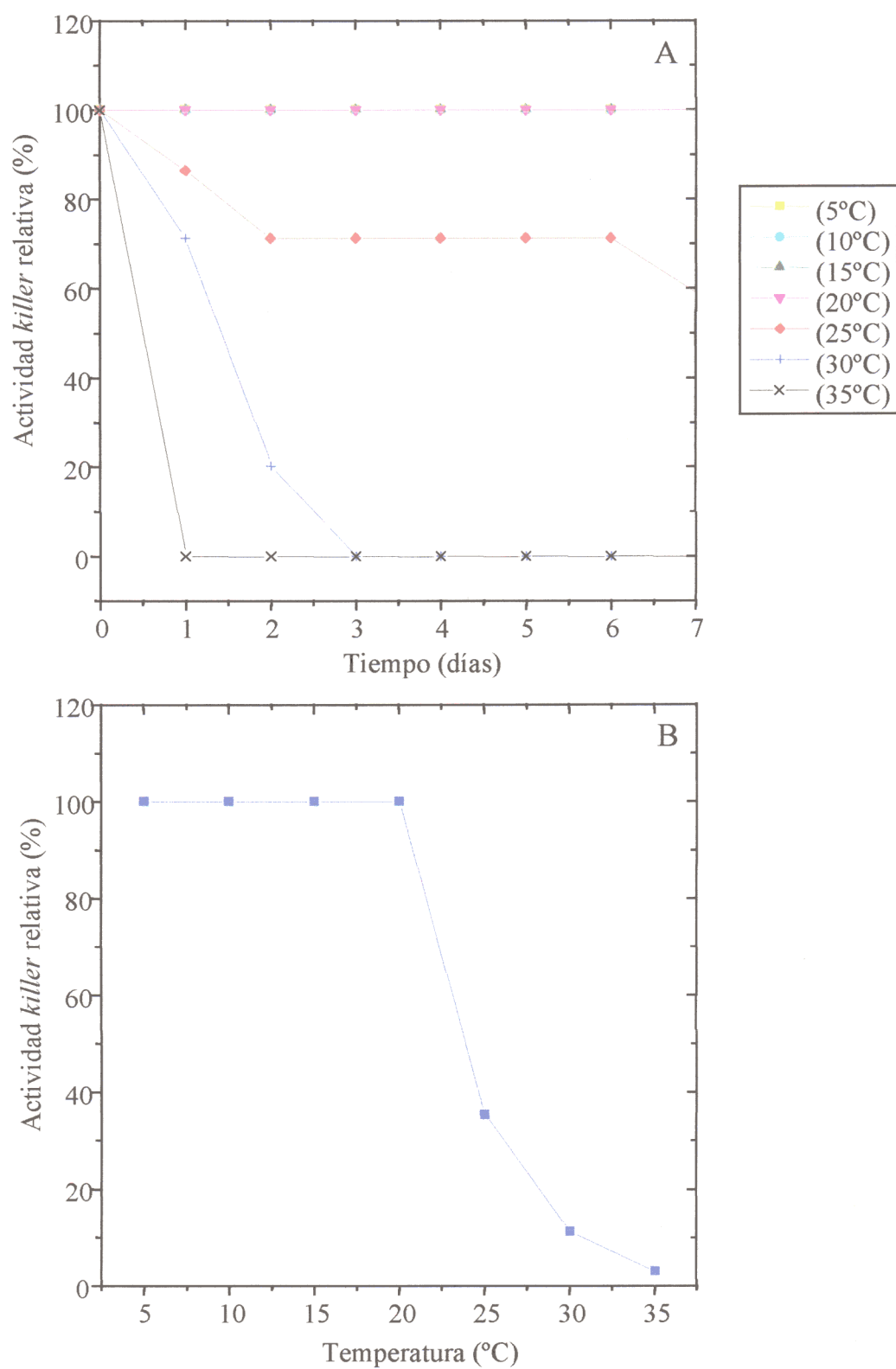


Figura 4.6.- Propiedades físico-químicas de la toxina *killer*. **A:** Efecto de la temperatura en la estabilidad de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106. **B:** Efecto de la temperatura en la actividad de la toxina *killer*.

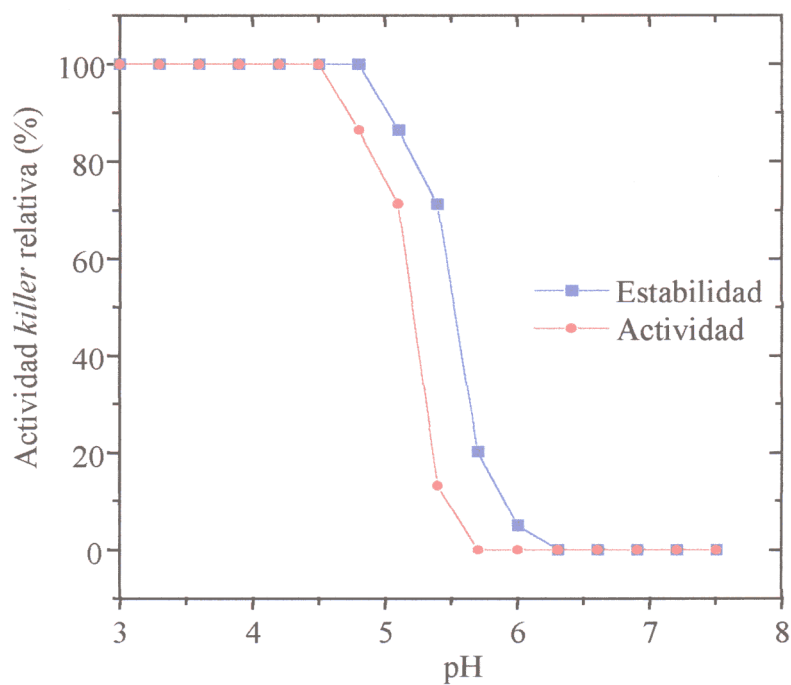


Figura 4.7.- Actividad y estabilidad de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 a diferentes valores de pH.

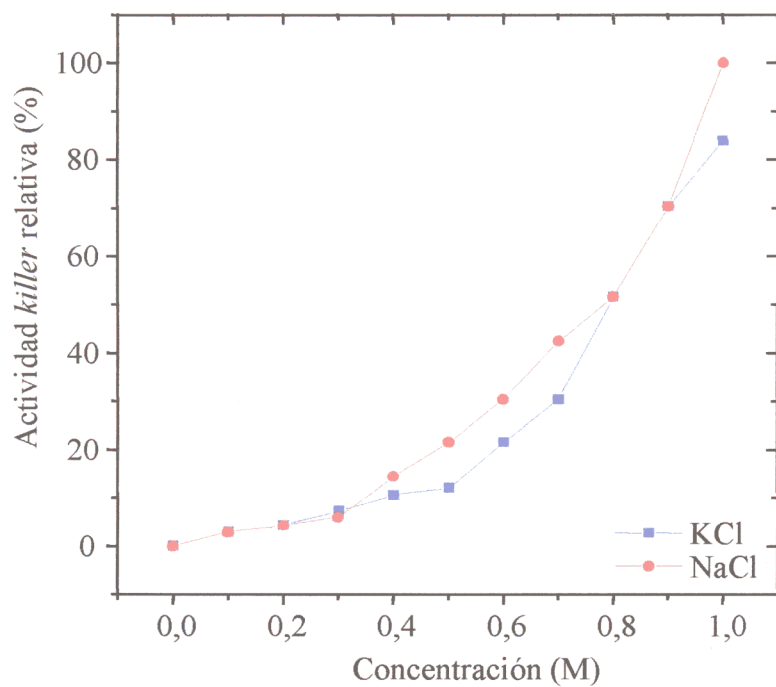


Figura 4.8.- Efecto comparativo del NaCl y KCl en la actividad aparente de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106.

4.5.- Efecto del NaCl y KCl en la actividad de la toxina *killer*.

Como se muestra en la figura 4.8 la actividad de la toxina sólo se observó en presencia de NaCl o KCl. Una disminución en la concentración de estas sales en el medio de detección de la actividad produjo una pérdida aparente de la actividad de la toxina.

4.6.- Estabilidad al pH y a la temperatura en presencia de NaCl.

4.6.1.- Estabilidad a la temperatura en presencia de NaCl.

La presencia en el medio de concentraciones de NaCl del 3 y 6% produjo una disminución en la estabilidad de la toxina como se muestra en la figura 4.9. Esta disminución de la estabilidad se observó en todas las temperaturas ensayadas independientemente de si esta era óptima (20°C) o no (25, 30 y 35°C).

4.6.2.- Estabilidad al pH en presencia de NaCl.

La estabilidad de la toxina al pH disminuyó notablemente en presencia de NaCl en los valores de pH ensayados (figura 4.10). Se ensayaron los pH comprendidos entre 4.8 y 6.0 por ser estos los más críticos para la estabilidad de la toxina. A valores de pH inferiores a 4.8 (pH 4.0) no se observó efecto alguno en la estabilidad.

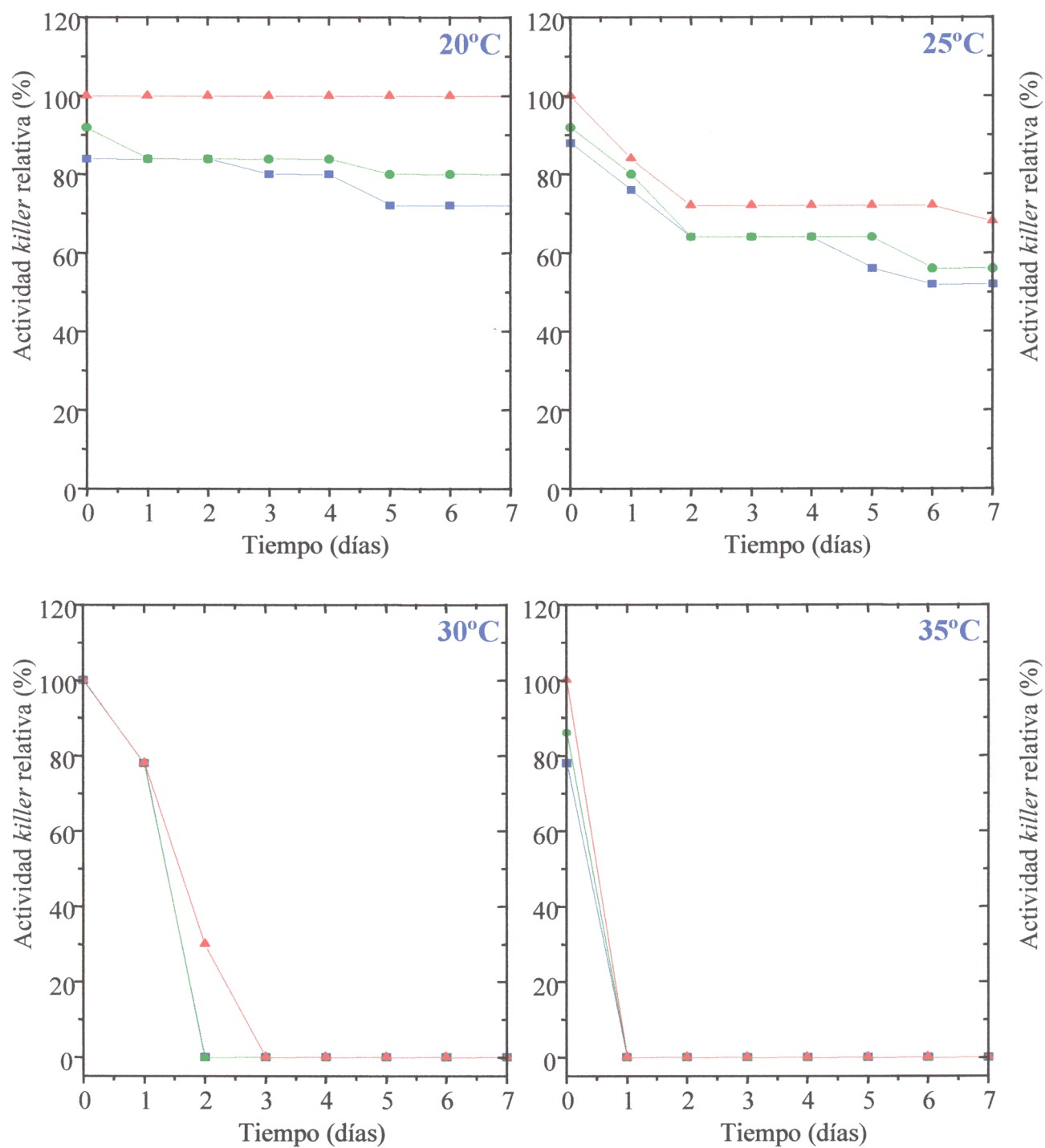


Figura 4.9.- Efecto del cloruro sódico en la estabilidad de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 a diferentes temperaturas. (▲): 0% NaCl; (●): 3% NaCl; (■): 6% NaCl.

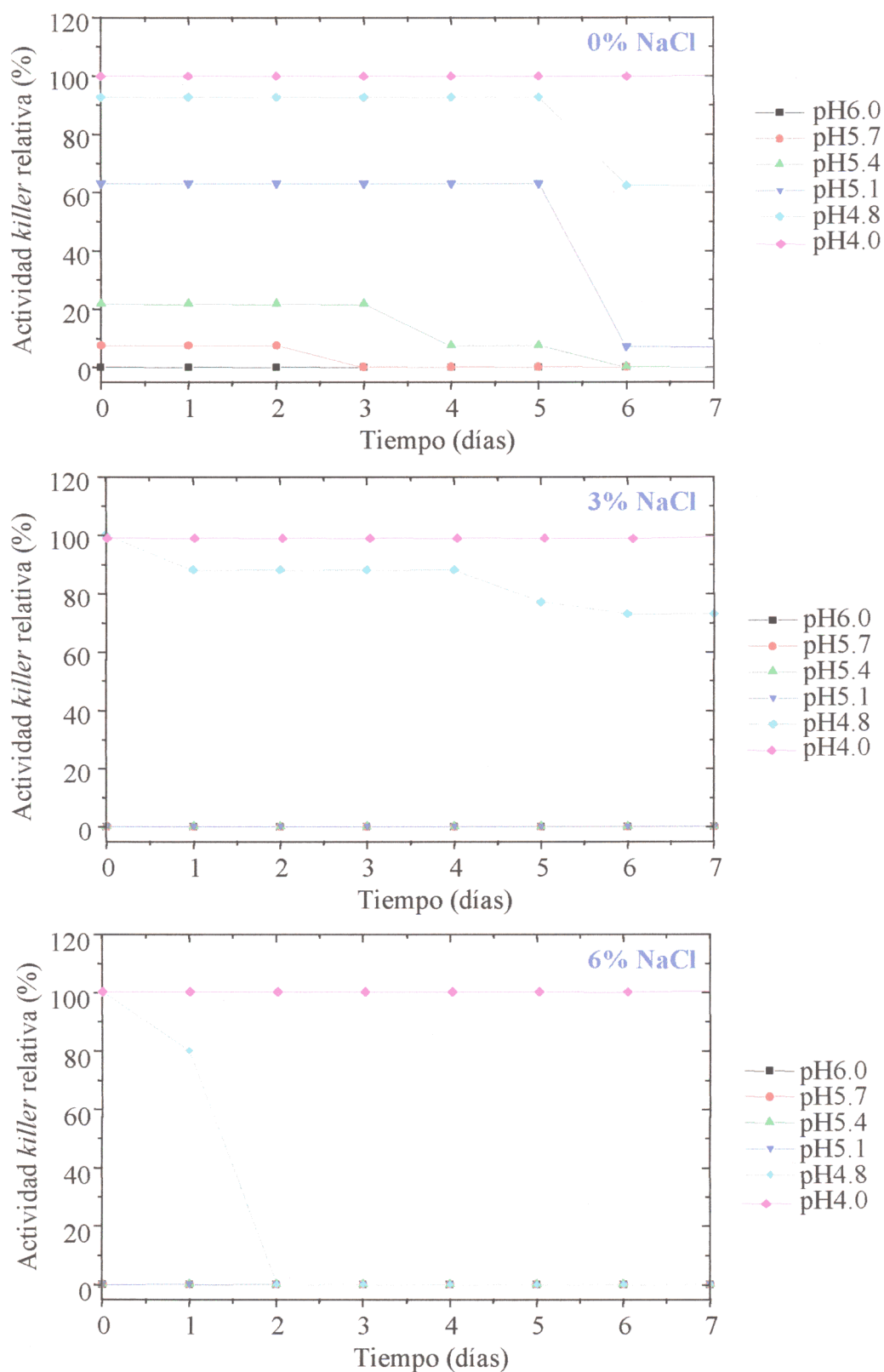


Figura 4.10 .- Estabilidad de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 al NaCl a diferentes valores de pH.

4.7.- Naturaleza de la actividad *killer* de *P. membranifaciens*.

En la tabla 4.6 se muestra la influencia que sobre la actividad *killer* tuvieron las tres proteasas estudiadas después de ser esta sometida a su acción durante 20 horas a 20°C a un pH de 4.2 unidades. Se pudo observar como la toxina perdió actividad en presencia de las proteasas, en relación a los controles sin tratar, lo que demuestra la naturaleza protéica de la toxina de *P. membranifaciens*. La papaína fue la proteasa más eficiente de las empleadas en causar la pérdida de actividad de la toxina *killer*, causando en esta un 100% de inactivación, frente al 78% que causó la pronasa.

Proteasa	Activa	Inactiva
Pronasa	78%	0*%
Pepsina	0%	0*%
Papaína	100%	0*%

Tabla 4.6.- Pérdida de actividad de la toxina *killer* por acción de diferentes proteasas activas o inactivadas por calor. Los porcentajes indican la porción de actividad perdida durante el tratamiento proteolítico. (*) Ligeramente estimulada de la actividad.

4.8.- Purificación de la actividad *killer* de *P. membranifaciens*.

El proceso de purificación (figura 4.11) comenzó con el concentrado del extracto crudo por filtración tangencial utilizando filtros de 10 kDa, seguida de una precipitación fraccionada (45% (v/v) → 75% (v/v)) con etanol absoluto a 0°C. Con la fracción de mayor actividad específica (75%) se realizó un isoelectroenfoco preparativo en Ultrodex (Pharmacia) en un rango de pH de 2.5 a 5 unidades. Por último, se realizó una cromatografía de afinidad empleando una columna de Sepharosa 6B-epoxi-activada unida a β -D-(1→6)-glucano purificado de la pared de *C. boidinii* IGC 3430.

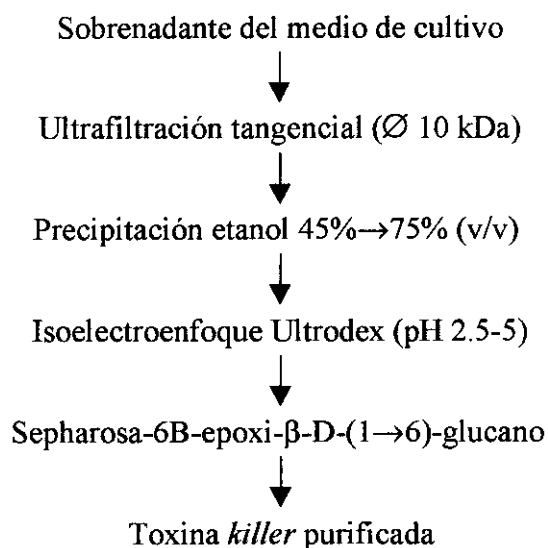


Figura 4.11.- Esquema del proceso de purificación de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106.

4.8.1.- Selección del material de partida.

Como material inicial para la purificación de la toxina de *P. membranifaciens* se partió de cultivos de tres días en medio YNB suplementado con 0.01% (p/v) de Brij-58, ya que en este medio se observó un importante aumento de la actividad específica (Tabla 4.5a). Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación (5000 rpm, 4°C) y posterior filtración (filtros de 0.45 µm), por último el sobrenadante obtenido se ultrafiltró.

4.8.2.- Concentración por ultrafiltración tangencial.

Debido al volumen utilizado en los cultivos (3 litros), se empleó un método de concentración por ultrafiltración tangencial utilizando filtros de 10 kDa de diámetro de poro (Filtron). El volumen inicial se redujo aproximadamente a 75 ml, como resultado del proceso se obtuvo un rendimiento del 50% y un grado de purificación de 5 veces.

4.8.3.- Precipitación fraccionada con etanol.

El sobrenadante concentrado se precipitó añadiendo etanol a 0°C lentamente y con agitación hasta una concentración del 45% (v/v) y posteriormente la concentración de etanol se llevó hasta el 75% (v/v).

Los resultados muestran que la mayor actividad específica corresponde a la fracción del 75% de etanol, razón por la cual fue la fracción seleccionada para continuar el proceso de purificación. El rendimiento y el grado de purificación fueron un 42% y un 31.2, respectivamente.

4.8.4.- Isoelectroenfoque preparativo en Ultrodex.

La muestra obtenida por precipitación con etanol al 75% se aplicó en geles de isoelectroenfoque preparativo. Terminado el proceso, el gel se dividió en fracciones y se determinó la actividad de las fracciones y su pH. En dichas condiciones preparativas se pudo observar un punto isoeléctrico aproximado de 3.9 unidades para las fracciones con actividad (Figura 4.12).

4.8.5.- Cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-epoxi- β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano.

Las fracciones que presentaron una actividad específica más alta en los geles de isoelectroenfoque preparativo se unieron y dializaron frente a tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 3.5 con un 15% (p/v) de glicerol. Tras este proceso la muestra se cargó en la columna de cromatografía de afinidad. Se recogieron 40 fracciones de 1 ml y tras este proceso se eluyó la actividad con tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 5.0, en presencia de 1.5 M NaCl y glicerol al 15% (p/v). En estas condiciones la toxina presenta cierto grado de inestabilidad, razón por la cual se ajustó su pH rápidamente a pH 4.0. Como resultado se obtuvo un único pico de actividad y proteína (Figura 4.13). El rendimiento fue de un 10% y el grado de purificación de 124.5 veces tras el proceso de purificación.

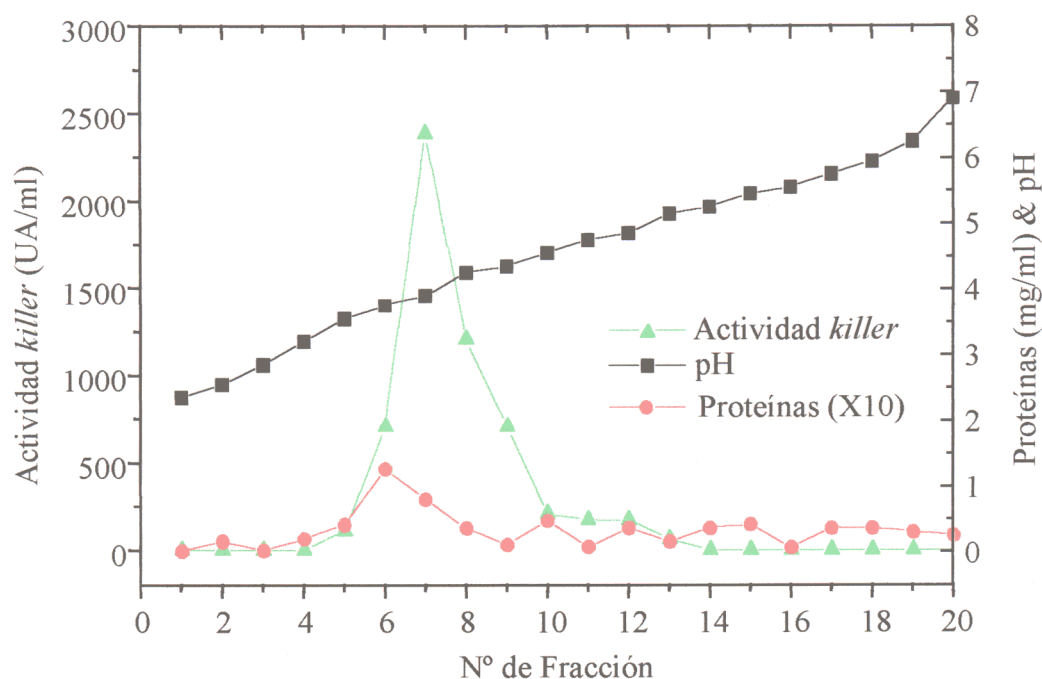


Figura 4.12.- Isoelectroenfoque preparativo en Ultrodex. La concentración de proteínas se muestra multiplicada por un factor de 10 para una mejor representación gráfica.

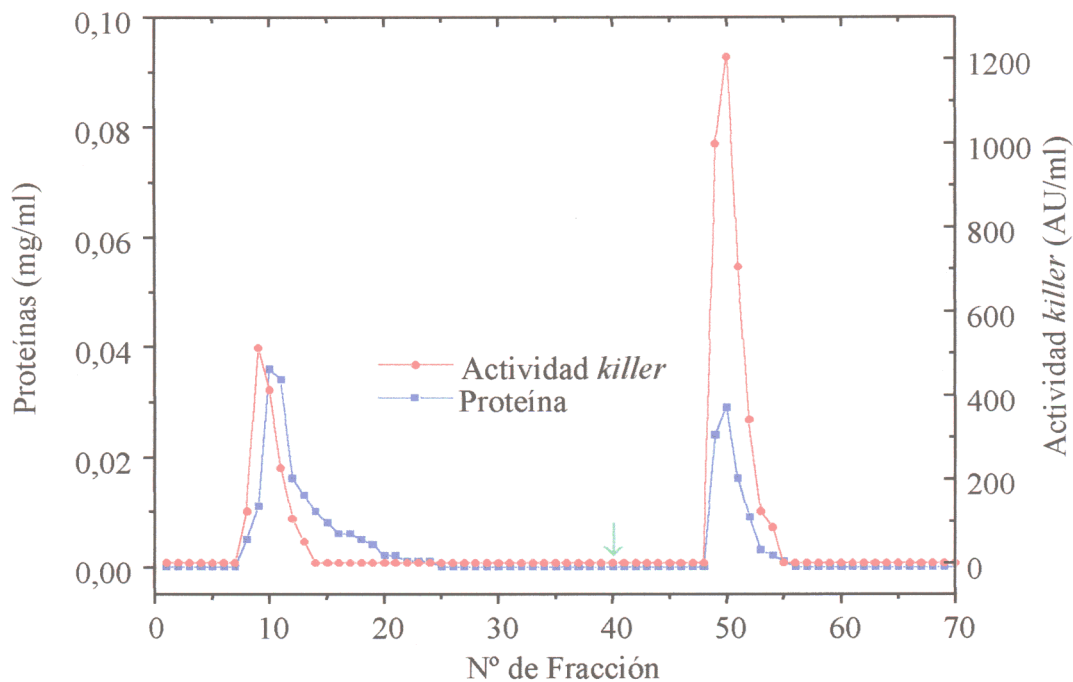


Figura 4.13.- Cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-epoxi-β-D-(1→6)-glucano. Las fracciones del isoelectroenfoque fueron eluidas y aplicadas en la cromatografía de afinidad. La actividad retenida se eluyó sustituyendo el tampón de cromatografía (↓) por tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 5.0, NaCl 1.5M.

4.8.6.- Electroforesis de la toxina *killer* purificada.

Las fracciones con actividad *killer* obtenidas en la cromatografía de afinidad se sometieron a electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes. De los resultados obtenidos se observa que la toxina tras este paso quedó purificada a homogeneidad, apareciendo una única banda de proteína en las electroforesis.

Una vez purificada la toxina se pudo calcular su masa molecular por comparación con patrones de masa molecular conocida. La toxina presentó, en los geles de poliacrilamida del 12%, un valor de Rf de 0.63. Interpolando dicho valor (Figura 4.14) se calculó para la toxina *killer* de *P. membranifaciens* una masa molecular aproximada de 18.000 Da.

4.8.7.- Tabla de purificación.

El rendimiento global del proceso de purificación fue del 10%. Los resultados obtenidos en cada paso del proceso de purificación quedan reflejados en la tabla 4.7.

Proceso de purificación	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (UA)	Actividad específica (UA/mg)	Factor	Rendimiento (%)
Sobrenadante	3000	0.034	102.2	33750	330.3	1.0	100
Concentrado (40X)	75	0.136	10.16	16875	1661.0	5.0	50
Etanol 45-75%	5	0.276	1.38	14196	10287.1	31.2	42
Isoelectro-enfoque	6	0.042	0.254	8586	33803.2	102.3	25
Cromatografía de afinidad	6	0.014	0.084	3454	41119.1	124.5	10

Tabla 4.7.- Tabla de purificación de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106.

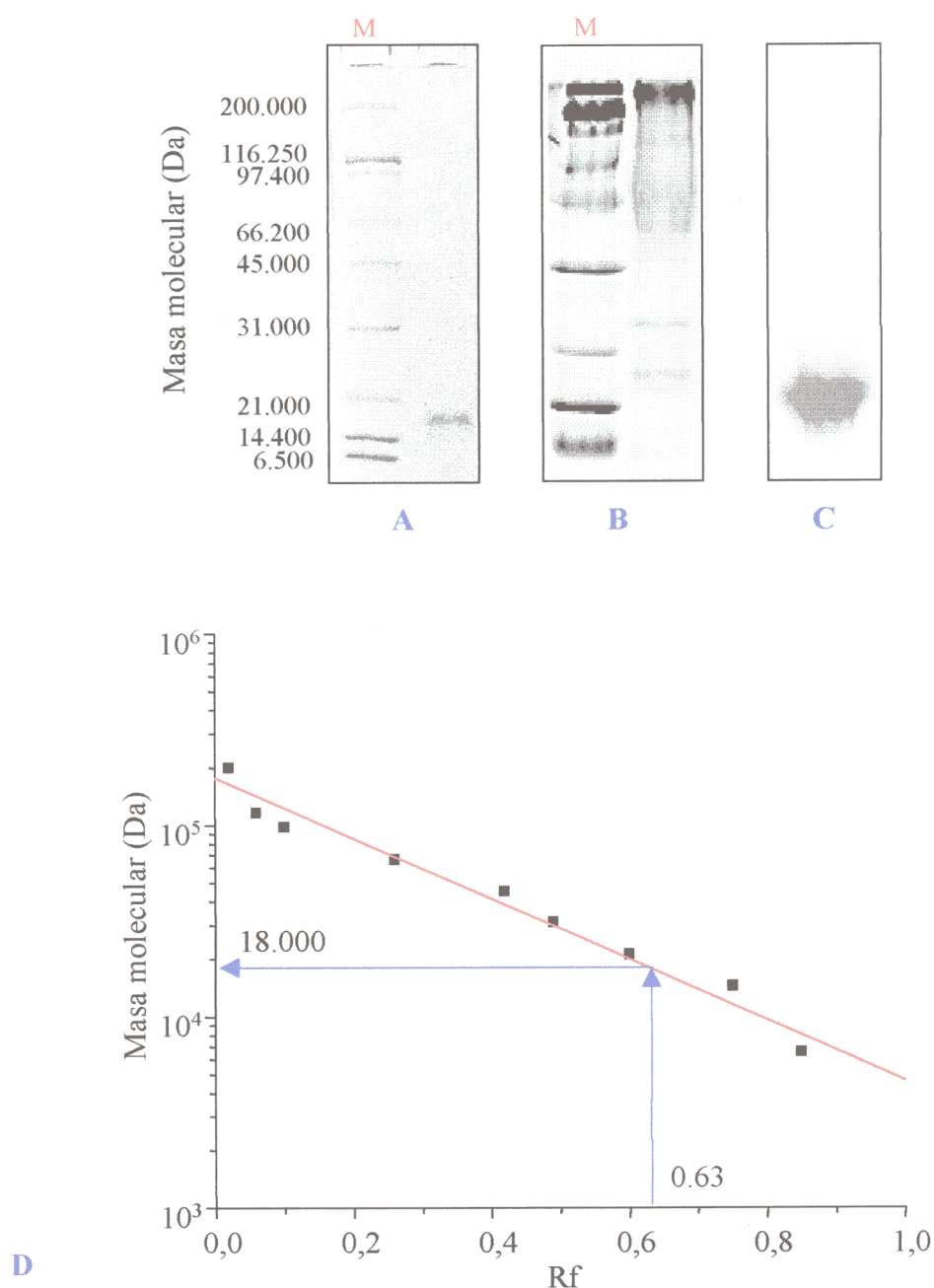


Figura 4.14.- Electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes en geles de poliacrilamida de la toxina killer de *P. membranifaciens* CYC 1106. **A:** PAGE-SDS toxina purificada. **B:** PAGE-SDS extracto crudo. **C:** Electroforesis en condiciones nativas de la toxina purificada. **D:** Relación entre el valor de los Rf de las proteínas control y su masa molecular. **M:** Marcadores de masa molecular conocida.

4.9.- Determinación del punto isoelectrico.

La toxina *killer* purificada se mostró homogénea en isoelectroenfoque. El punto isoelectrico calculado para la toxina *killer* por isoelectroenfoque analítico fue de 3.91 unidades (Figura 4.15). El gradiente de pH establecido fue lineal entre 3.0 y 5.5 unidades de pH.

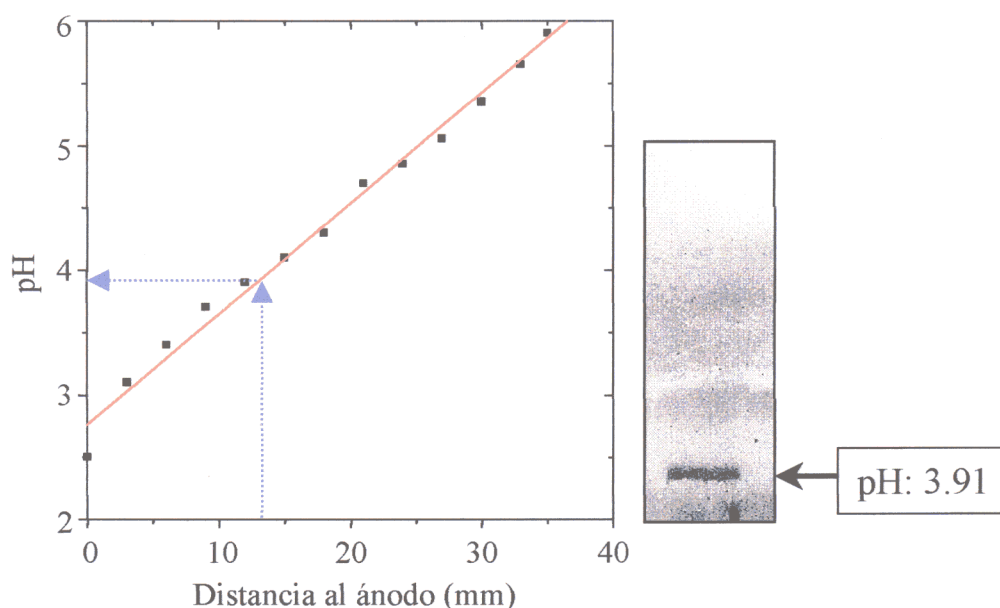


Figura 4.15.- Punto isoelectrico de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106. Se representa el gradiente de pH determinado en un gel de isoelectroenfoque analítico.

4.10.- Determinación del caracter glicoprotéico.

Tras la realización de una electroforesis PAGE-SDS de la toxina purificada, el gel obtenido se tiñió para poner de manifiesto la presencia de carbohidratos en la toxina empleando el método PAS (ácido periódico-reactivo de Schiff). Tras la tinción no se observó la aparición de bandas de color púrpura características de esta tinción por lo que la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 pudiera no tener caracter glicoprotéico.

4.11.- Caracterización del receptor de pared celular.

4.11.1.- Obtención de paredes de *C. boidinii*.

Las paredes celulares de *C. boidinii* se obtuvieron a partir de cultivos de 5 días a 30°C siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de material y métodos. Se determinó la eficiencia del proceso mediante observación microscópica. Las paredes celulares obtenidas representaron un 21.4 % del peso seco de la levadura empleada.

4.11.2.- Fraccionamiento de las paredes celulares de *C. boidinii*.

4.11.2.1.- Fraccionamiento para la obtención de glucanos.

Para el proceso de fraccionamiento descrito en el apartado 3.15 se emplearon 6.0 gramos de paredes celulares de *C. boidinii* IGC 3430.

En la tabla 4.8 se muestran las cantidades obtenidas de cada una de las fracciones tras el proceso y el porcentaje que representan respecto al total de la pared celular. Debe tenerse en cuenta que la fracción S-1 no corresponde a ningún tipo de glucanos de la pared sino a manoproteínas de la misma. Se incluye esta fracción S-1 en este apartado por el hecho de estar incluida su extracción en el proceso de obtención de glucanos. Por el procedimiento empleado en su extracción, estas manoproteínas difieren en sus características de las obtenidas empleando el protocolo descrito en el apartado siguiente.

4.11.2.2.- Obtención de manoproteínas.

Las manoproteínas obtenidas por el método descrito por Schmitt, M. & Radler, F. (1987) representaron aproximadamente el 10% de la pared de la levadura. La tabla 4.8 recoge los resultados obtenidos.

4.11.2.3.- Obtención de quitina.

La quitina en levaduras representa un porcentaje muy pequeño de la pared celular y se encuentra localizada fundamentalmente en las cicatrices de gemación. La cantidad de quitina extraída representó un 1.95% del peso de las paredes de las células empleadas en su extracción (tabla 4.8).

Fracción	Peso (mg)	Porcentaje (%)
S-1	930	15.50
S-2	1320	22.00
P-1	220	3.60
P-2	2320	38.60
Manoproteínas*	250	10.00
Quitina	10.9	1.95

Tabla 4.8.- Fraccionamiento de las paredes celulares de *C. boidinii* CYC 1106. La obtención de glucanos, manoproteínas y quitina se realizó de forma independiente y empleando para ello diferentes cantidades de paredes celulares. (*): Manoproteínas extraídas por el método descrito por Schmitt & Radler (1987).

4.11.3.- Adsorción de la toxina a las fracciones de la pared de *C. boidinii*.

Para determinar cual o cuales de las fracciones extraídas de la pared de la levadura sensible pudiera estar actuando como receptor de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* se incubó dicha toxina (extracto crudo concentrado) con las distintas fracciones. Como resultado de la incubación se pudo observar que sólo dos de las fracciones ensayadas (fracciones P-1 y P-2) fueron capaces de retener la actividad *killer* (Figura 4.16).

Ninguna de las fracciones en un principio pertenecientes, por la metodología empleada en su extracción, al grupo de las manoproteínas fue capaz de producir disminución en la actividad. Estos resultados indicarían que algún tipo de glucano de la pared sería el receptor primario para la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106. El receptor aislado estaría, según los resultados, contenido fundamentalmente en la fracción P-1.

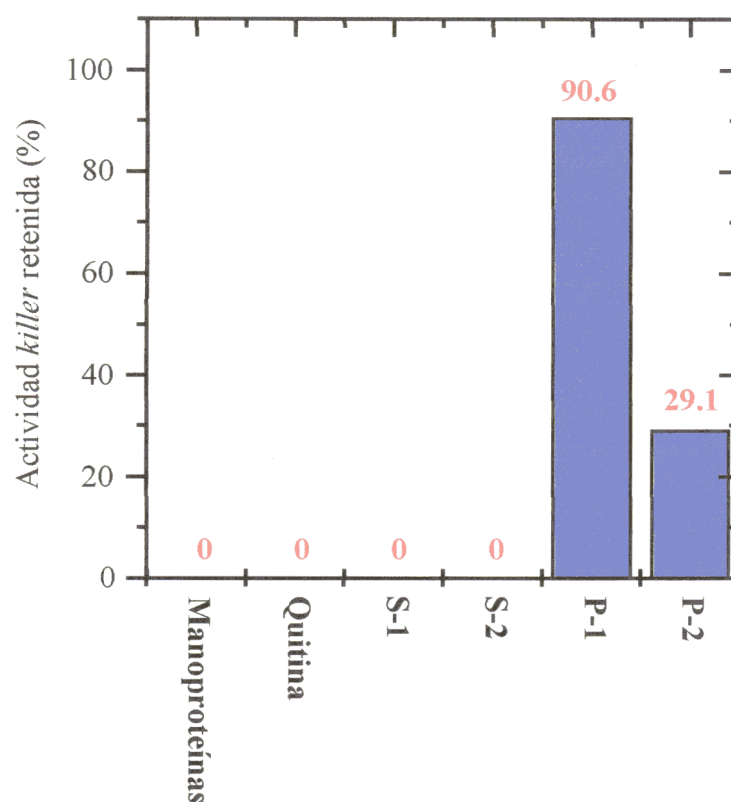


Figura 4.16.- Capacidad de adsorción de toxina de las diferentes fracciones aisladas de la pared de la levadura sensible *C. boidinii* IGC 3430.

4.11.4.- Especificidad de la capacidad de adsorción de la fracción P-1 de pared.

Para determinar si la adsorción de la toxina *killer* a la fracción P-1 (la fracción más eficaz en adsorber la actividad *killer*) era específica se determinó la capacidad de esta fracción para adsorber proteínas en su estructura (albúmina de suero bovino); proteína no relacionada con la toxina *killer*. La determinación de la adsorción se realizó valorando por el método de Bradford la cantidad de proteína presente antes y después de poner la albúmina en contacto

con la fracción de pared. Como resultado de esta experiencia se observó la ausencia de adsorción de la albúmina a la fracción P-1 y sí a la existencia de adsorción (expresada como disminución de proteína y de actividad) en el extracto crudo concentrado (Tabla 4.9).

	Proteína inicial ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Proteína final ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Proteína adsorbida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Actividad <i>killer</i> inicial (UA ml^{-1})	Actividad <i>killer</i> final (UA ml^{-1})
Albúmina	1657.3	1650.3	2.0	-	-
Extracto <i>killer</i> concentrado	1587.5	1434.8	152.7	206	0

Tabla 4.9.- Especificidad de la adsorción de proteínas por la fracción P-1.

4.11.5.- Especificidad de la unión de la toxina a polisacáridos.

Para la determinación de la especificidad de la unión de la toxina a su receptor primario se puso en contacto extractos de dicha toxina con diferentes polisacáridos de naturaleza conocida que se obtuvieron por vía comercial (amilosa y amilopectina), o bien, se purificaron a partir de distintas fuentes (pustulano y quitina de gamba) o bien fueron cedidos ya purificados por otros grupos de investigación.

Según queda reflejado en la tabla 4.10 sólo se observó disminución de la actividad *killer* en aquellos ensayos en los cuales la toxina estuvo en contacto con polisacáridos con enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 6) en su estructura. Ambos polisacáridos de tipo β -(1 \rightarrow 6), el glucano extraído de *Penicillium allahabadense* y el extraído de *Umbilicaria pustulata* (pustulano) pese a tener origen diferente (un hongo filamentoso y un líquen, respectivamente) presentaron igual capacidad de adsorción de la toxina. En presencia de estos polisacáridos toda la actividad *killer* ensayada desapareció del medio (147 UA/ml). Por tanto, sólo los polisacáridos con enlaces β -(1 \rightarrow 6) son capaces de actuar como receptores de la toxina de *P. membranifaciens*.

Polisacáridos	Tipos de enlace	Polisacárido (mg/ml)	Actividad relativa (%)	Adsorción
Amilosa	α -(1→4)	15	100	-
Amilopectina	α -(1→4)	15	100	-
Ácido poligalacturónico	α -(1→4)	15	100	-
Pululano	α -(1→6)	15	100	-
Laminarina	β -(1→3)	15	100	-
Xilano	β -(1→4)	15	100	-
Quitina	β -(1→4)	15	100	-
Liquenano	β -(1→3) y β -(1→4)	15	100	-
Pustulano	β -(1→6)	15	0	+
Glucano <i>P. allahabadense</i>	β -(1→6)	15	0	+
Control ¹	No	0	100	-

Tabla 4.10.- Especificidad de la adsorción de la toxina a diferentes polisacáridos. ¹Control realizado con toxina en ausencia de polisacárido (100% de actividad relativa).

4.11.6.- Capacidad de adsorción de los glucanos tratados con NaIO_4 .

El metaperiodato es un agente oxidante capaz de romper las moléculas de glucanos allí donde existen dos grupos hidroxilos contiguos. Para determinar la importancia de la estructura de los glucanos en la adsorción de la toxina, los glucanos P-1 y P-2 se trataron con metaperiodato sódico (Figura 4.17). Como consecuencia del tratamiento químico se pudo observar que estos polisacáridos perdieron una gran parte de su capacidad de adsorber la toxina (67.9% de reducción en P-1 y 100% en P-2).

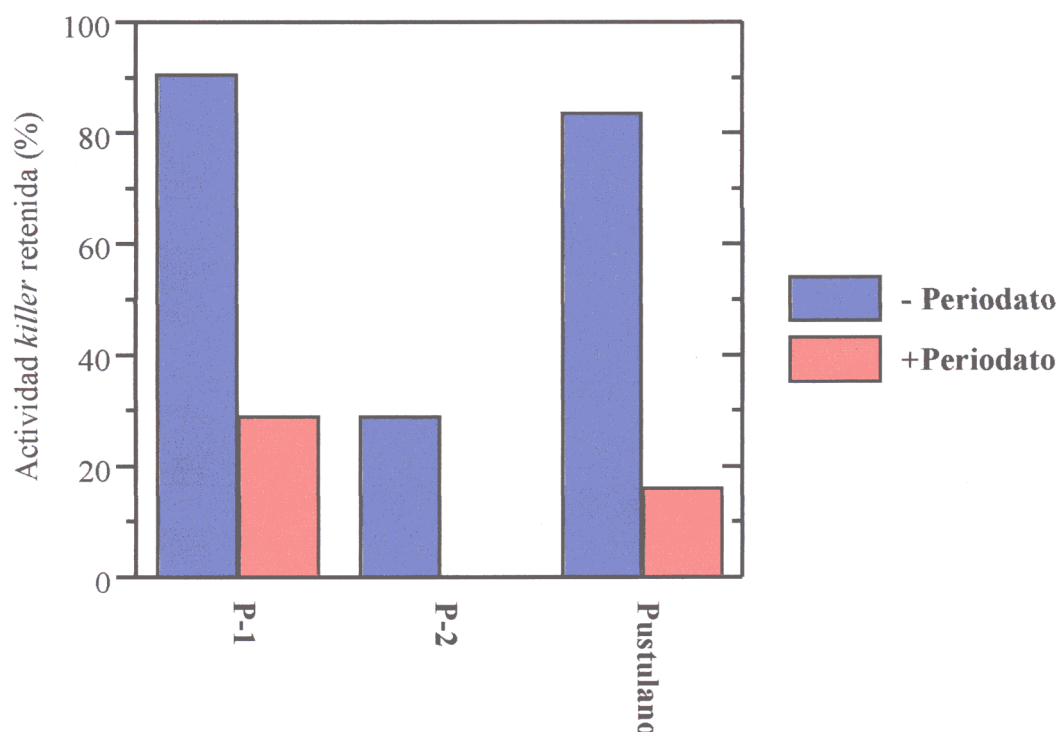


Figura 4.17.- Adsorción de la toxina *killer* a las fracciones de pared P-1 y P-2 tratadas con periodato sódico. Como control se empleó el polisacárido pustulano.

4.11.7.- Análisis químico de las fracciones P1 y P2.

4.11.7.1.- Hidrólisis ácida de las fracciones y análisis por cromatografía de gases (GLC).

Los productos de la hidrólisis de los polisacáridos son sustancias no volátiles. Por ello fue necesario derivatizarlos para su identificación posterior por GLC (Figura 4.18). El rendimiento de la hidrólisis varió según la muestra analizada, un 73.72% de la fracción P-1 pudo ser hidrolizada con el tratamiento empleado, frente al 54.81% de la fracción P-2. El elevado porcentaje de glucosa en las fracciones analizadas reveló la naturaleza de tipo glucano de éstas, resultado que confirma la eficacia del proceso de extracción de glucanos empleado (Tabla 4.11).

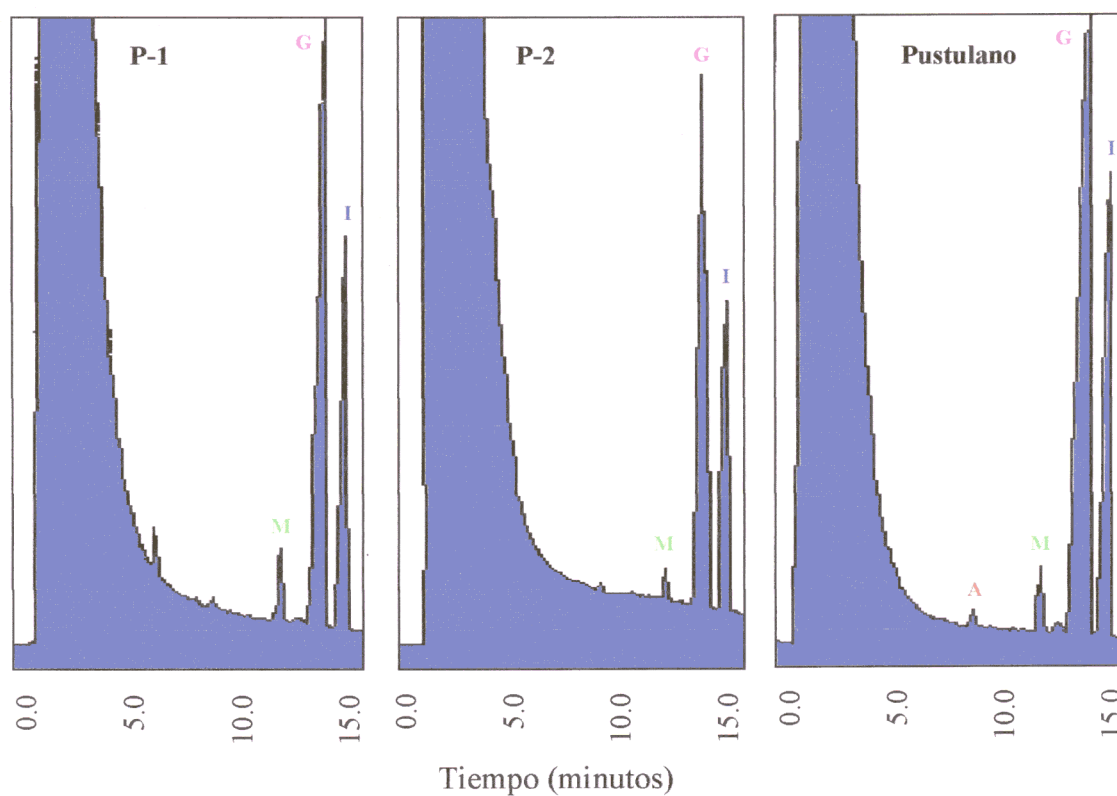


Figura 4.18.- Cromatogramas correspondientes al análisis por GLC (cromatografía de gases) de los azúcares liberados por la hidrólisis química. **M**: manosa, **A**: arabinosa, **G**: glucosa, **I**: inositol (control interno).

	Fracción P-1	Fracción P-2	Pustulano
Rendimiento digestión (%)	73.72	54.81	81.21
Glucosa (%)	95.1	97.58	98.30
Manosa (%)	4.90	2.41	0.67
Arabinosa (%)	0.00	0.00	1.00

Tabla 4.11.- Composición química de las fracciones y rendimiento del proceso de hidrólisis química.

4.11.8.- Análisis estructural de las fracciones P-1 y P-2 de la pared de *C. boidinii*.

4.11.8.1.- Oxidación con periodato sódico.

El consumo de periodato (valorado espectrofotométricamente a 223 nm) y la posible producción de ácido fórmico (valorado volumétricamente) debido a la acción del mismo, dan idea del porcentaje de los diferentes enlaces que pueden encontrarse en las moléculas de los polisacáridos. El empleo de esta técnica permitió conocer que los glucanos P-1 y P-2, así como el pustulano empleado como control, presentan enlaces de tipo (1→6). Esta presencia es mayor en la fracción P-1 (la fracción que adsorbe la toxina con mayor eficacia) en la que un 85% de los enlaces de la misma son de este tipo. La fracción P-2 presentó un 24% de enlaces (1→6) y un 76% de enlaces (1→3) (Tabla 4.12).

	Fracción P-1	Fracción P-2	Pustulano	Glucosa
Consumo periodato ¹	1.701	0.530	1.876	4.813
Producción Ác. fórmico ²	0.848	0.242	0.909	4.464
Enlace (1→6) (%)	84.80	24.24	90.90	-
Enlace (1→4) (%)	0.38	0.14	5.80	-
Enlace (1→3) (%)	14.82	75.62	3.30	-

Tabla 4.12.- Porcentaje de cada uno de los enlaces presentes en las fracciones P-1 y P-2 de la pared de *C. boidinii* IGC 3430.¹Consumo de periodato expresado en Moles IO_4^- Mol⁻¹residuo hexosa.²Producción de ácido fórmico expresado en Moles ác. fórmico Mol⁻¹residuo hexosa.

4.11.8.2.- Espectrofotometría de infrarrojos (IR).

En los espectros infrarrojos mostrados en la figura 4.19 se observa, para todas las fracciones, una banda que aparece a 890 cm^{-1} lo que indica una alta riqueza de enlaces β . La inexistencia de bandas a 1750 cm^{-1} indica que los glucanos estudiados no poseen ácidos orgánicos esterificados como ocurre en el glucano de *Penicillium erythromellis* que presenta dicha banda por ser un β -malono-glucano.

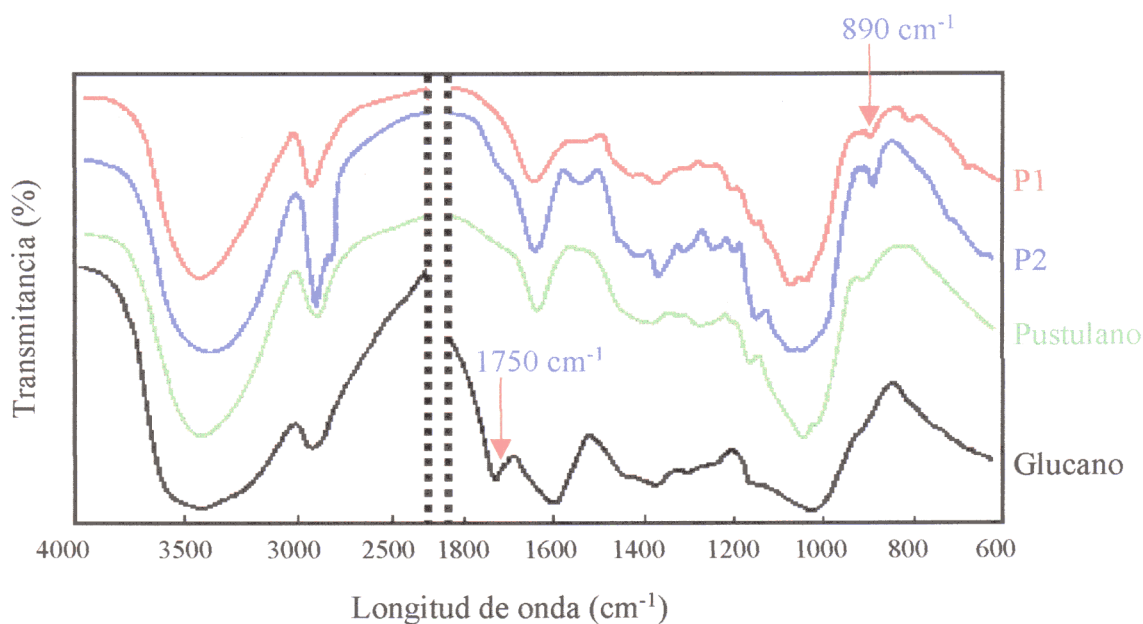


Figura 4.19.- Espectro de infrarrojos de la fracción P-1, P-2, Pustulano y glucano de *P. erythromellis*. Se muestran las bandas a 890 cm^{-1} (que indica la presencia de anómeros de glucosa en configuración β) y a 1750 cm^{-1} (que indica la existencia de ácidos orgánicos esterificados).

4.11.8.3.- Resonancia magnética nuclear (^1H -RMN).

En el espectro de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN) de la fracción P-1, objeto de caracterización más exhaustiva, debido a su mayor capacidad en adsorber la toxina *killer* secretada por *P. membranifaciens* CYC 1106, se observan las señales correspondientes al enlace β -(1 \rightarrow 6), entre 4.5 y 4.6 ppm como se indica en la figura 4.20.

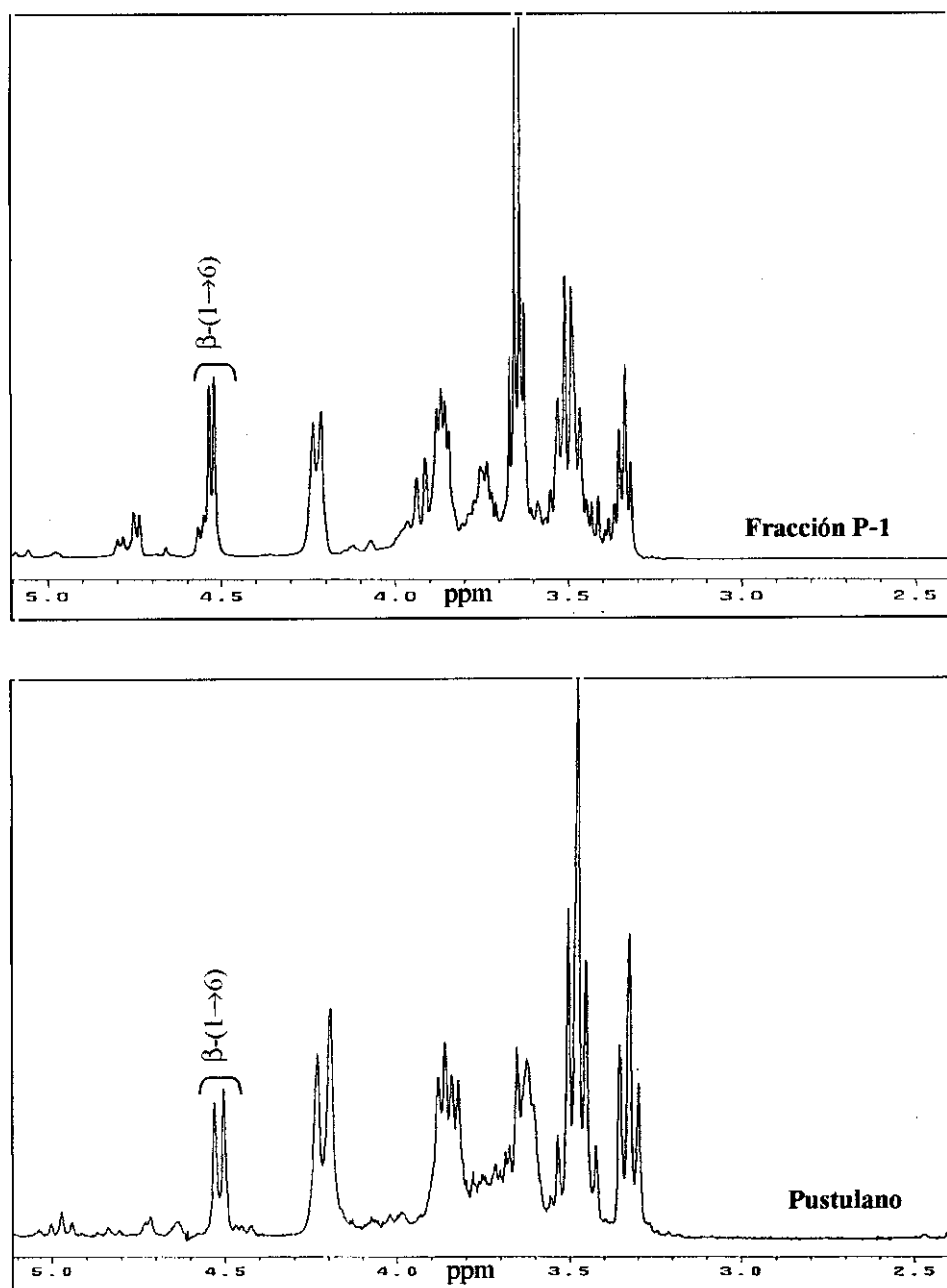


Figura 4.20.- Espectro de ^1H -RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de la fracción P-1. Como control se ha empleado el polisacárido pustulano. Se destacan las señales correspondientes al enlace $\beta-(1\rightarrow6)$.

4.12.- Velocidad de adsorción de la toxina a la fracción P-1 de la pared.

Como se puede observar en la figura 4.21 la adsorción de la toxina a la fracción P-1, obtenida de la pared de *C. boidinii* IGC 3430, es un proceso rápido que acontece en cuestión de pocos minutos. La velocidad de adsorción de la toxina en las condiciones ensayadas fue de 760.2 UA/min, valor de la pendiente de la recta obtenida en el inicio del ensayo realizado.

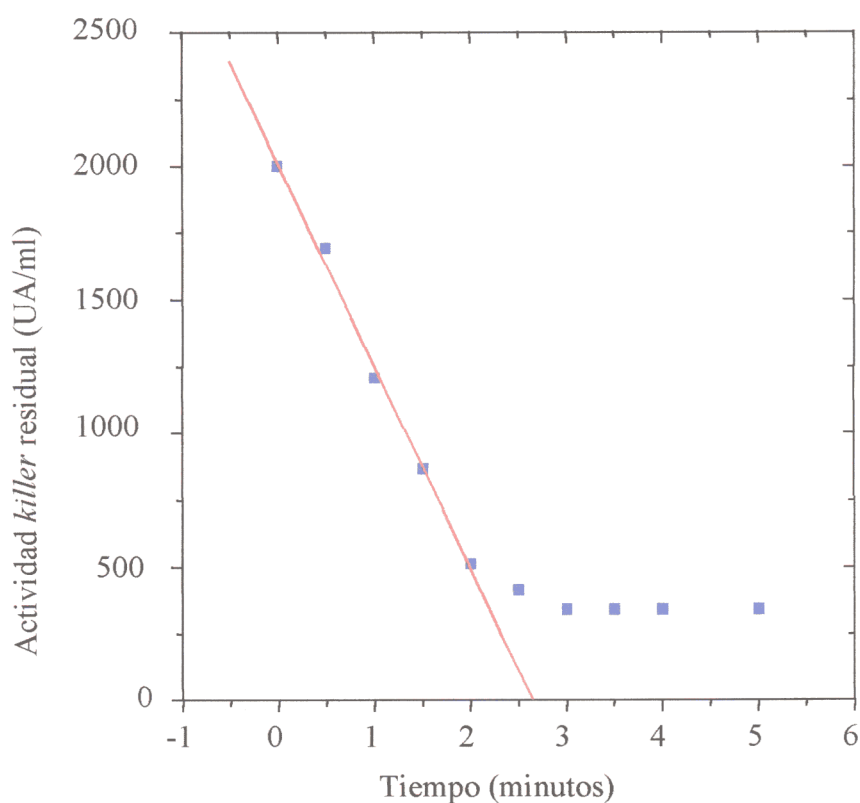


Figura 4.21.- Velocidad de adsorción de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 a la fracción P-1 de la pared de *C. boidinii* IGC 3430. En la gráfica se representa la actividad *killer* que permanece residual (no unida) en cada una de las muestras obtenidas a los diferentes tiempos.

4.13.- Acción de la toxina sobre los protoplastos de *C. boidinii*.

Los protoplastos de *C. boidinii* (Figura 4.22) se mostraron sensibles a la acción de la toxina *killer*. La tasa de regeneración de dichos protoplastos fue de $1.27\% \pm 0.06$ en presencia de toxina *killer* desnaturalizada por calor. Los protoplastos tratados con toxina activa presentaron una tasa de regeneración del $0.011\% \pm 0.003$, es decir, 115 veces inferior, lo que indica su sensibilidad al tratamiento con toxina. Este hecho pudiera indicar, además, que la presencia de la pared no es indispensable para la acción de la toxina *killer*. De modo que la toxina podría actuar directamente sobre la membrana plasmática.

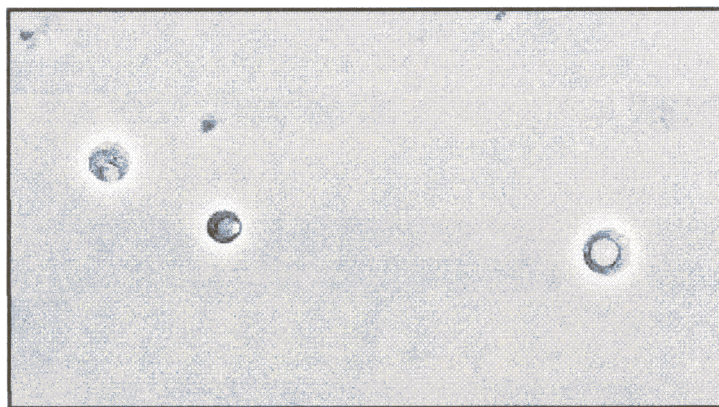


Figura 4.22.- Fotografía de protoplastos obtenidos de *C. boidinii* IGC 3430.

4.14.- Efectos de la toxina *killer* sobre las células sensibles de *C. boidinii*.

4.14.1.- Cinética de muerte celular por acción de la toxina *killer*.

La tasa de muerte (k) para las células tratadas con toxina *killer* fue de 0.401 h^{-1} en las condiciones ensayadas. El tratamiento de las células con toxina produjo una disminución en el número de células viables del 93.5% en 9 horas. Durante la primera hora de exposición no se observó disminución en el número de células viables, existiendo por tanto, una fase de latencia previa a la aparición de la muerte celular. La tasa de crecimiento de las células empleadas como control (toxina inactivada por calor) fue de 0.204 h^{-1} (Figura 4.23).

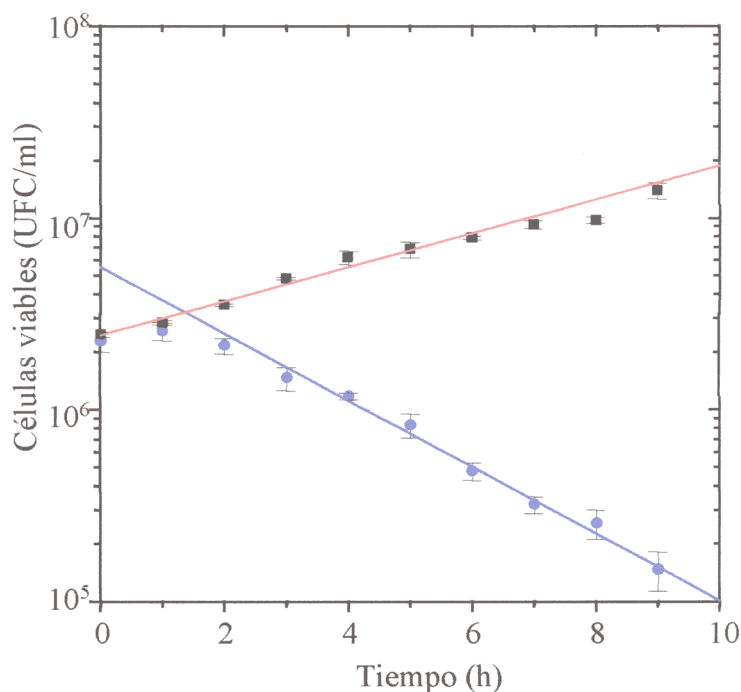


Figura 4.23.- Cinética de muerte de la levadura sensible *C. boidinii* en presencia de toxina *killer* (●). Como control se muestra el crecimiento de la misma levadura en presencia de toxina inactivada con calor (■).

4.14.2.- Acción de la toxina sobre la integridad de la membrana plasmática.

Como se muestra en la Figura 4.24 la integridad de la membrana plasmática determinada con ioduro de propidio (IP) por citometría de flujo, no se vió alterada por la existencia de toxina *killer* en el medio hasta tiempos de incubación considerables. El ioduro de propidio, incapaz de penetrar por una membrana plasmática intacta, sólo pudo ser detectado en las células tras varias horas de exposición a la toxina. Como control se muestran los histogramas correspondientes de células sin teñir (autofluorescencia) y células teñidas con IP permeabilizadas por calor y etanol.

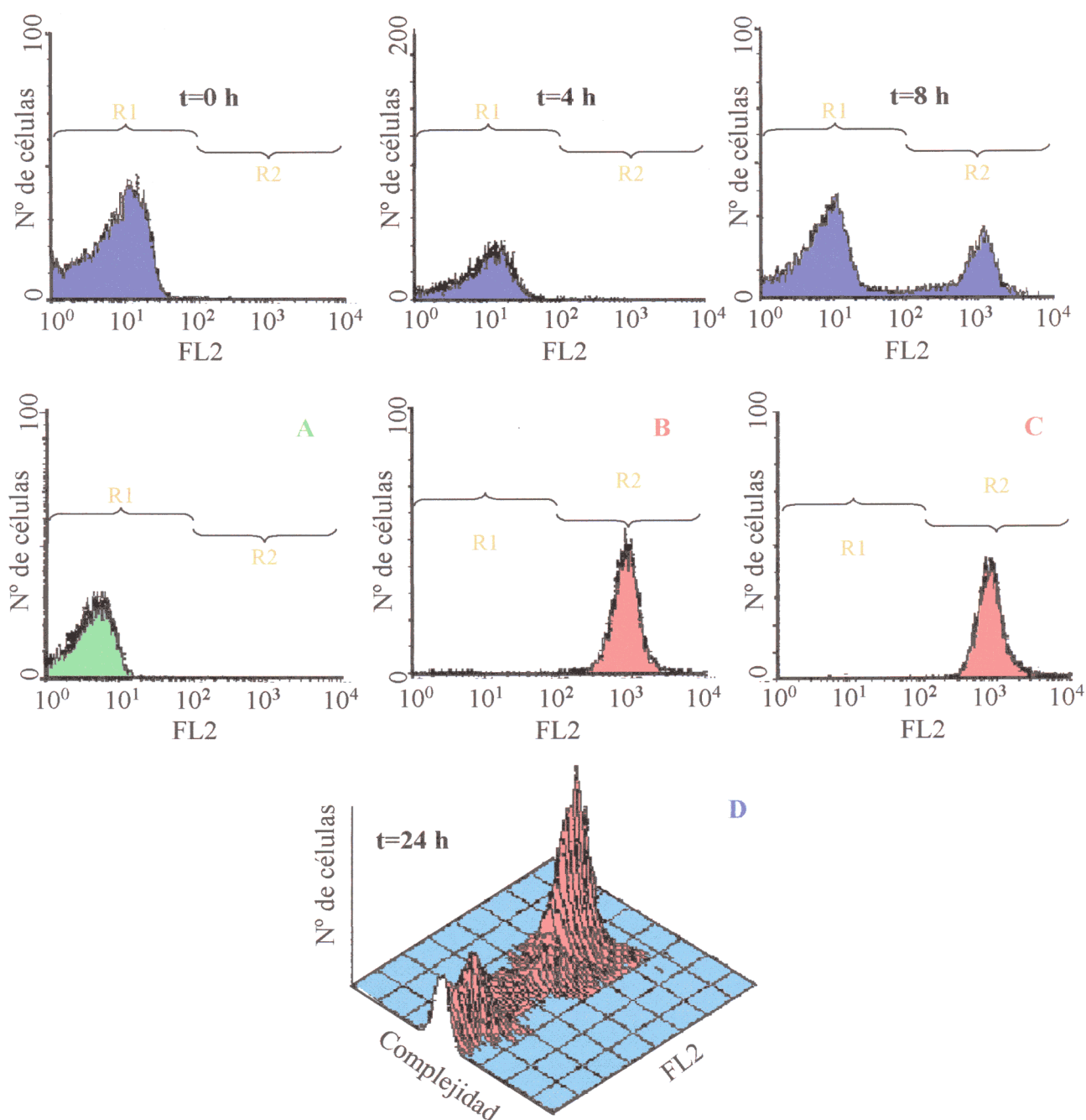


Figura 4.24.- Determinación de la integridad de la membrana plasmática por citometría de flujo. Las tres figuras superiores muestran la fluorescencia (FL2) de las células tratadas con la toxina *killer* a tres tiempos de incubación (0, 4 y 8 horas). Las 4 inferiores muestran: (A) autofluorescencia de las células de *C. boidinii* en ausencia de yoduro de propidio, (B y C) fluorescencia emitida por células permeabilizadas con calor y etanol al 70%, respectivamente. Las regiones R1 y R2 han sido determinadas por comparación con las células permeabilizadas con etanol o calor. (D) Representación tridimensional de la fluorescencia emitida por células tratadas con toxina *killer* durante 24 horas. Se observa la existencia de un elevado número de células con una alta fluorescencia (membrana plasmática permeable al IP). El término complejidad hace referencia a la luz dispersada por las células que aporta información acerca de la complejidad del contenido intracelular.

Tiempo (h)	Toxina activa		Toxina inactiva	
	Fluorescencia media en la población	Porcentaje en R1 (%)	Fluorescencia media en la población	Porcentaje en R1
0	9.64	99.87	10.52	99.63
4	12.55	98.84	11.09	98.96
8	330.06	69.64	9.35	99.32

Tabla 4.13.- Valores de fluorescencia media de la población total y porcentajes de la población celular comprendida en la región R1, región que delimita las células que poseen su membrana plasmática intacta. Dicha región se ha delimitado por comparación con las poblaciones de células permeabilizadas con etanol y calor (Figura 4.24).

	Fluorescencia media en R1	Porcentaje en R1	Fluorescencia media en R2	Porcentaje en R2
Autofluorescencia	4.94	100	-	0
Calor	8.63	1.26	896.20	98.74
Etanol 70%	10.11	0.33	1050.61	99.67

Tabla 4.14.- Valores de fluorescencia media y porcentajes de la población comprendida en las regiones R1 y R2, regiones que separan las células que poseen su membrana plasmática intacta de las que no la poseen. Dichas regiones se han delimitado por comparación con las poblaciones de células permeabilizadas con etanol y calor.

4.14.3.- Efecto en la concentración celular de K^+ y Na^+ .

La salida de potasio de las células se determinó por fotometría de llama. La salida de K^+ de las células tratadas con toxina aumentó de forma significativa a diferencia de las células tratadas con toxina inactivada por calor (Figura 4.25). La concentración de K^+ detectado en el exterior de las células incrementó con el tratamiento con toxina, confirmando la salida de potasio de las células. Se determinó la concentración de sodio en las células para determinar la posible entrada de este ión en presencia de la toxina activa e inactivada. No se determinaron las concentraciones extracelulares de Na^+ ya que la elevada concentración de este en el medio, no permitiría la observación de cambios en su concentración debidos a la entrada/salida desde las células. Como resultado se pudo observar la existencia de una entrada de sodio en las células a partir de las 1.5 horas de exposición en presencia de la toxina *killer* (Figura 4.26).

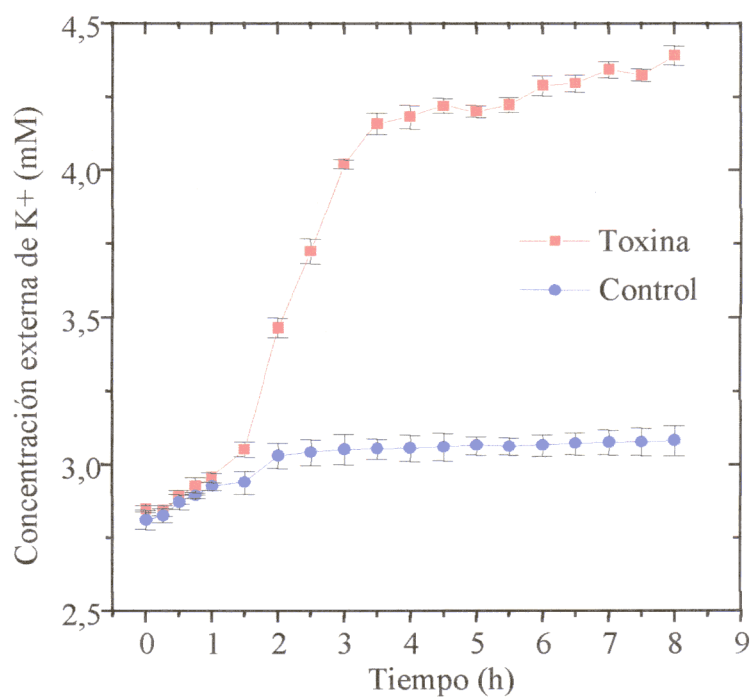


Figura 4.25.- Determinación por fotometría de llama de la salida de potasio al exterior de las células tratadas con toxina *killer* y con toxina *killer* inactivada (Control).

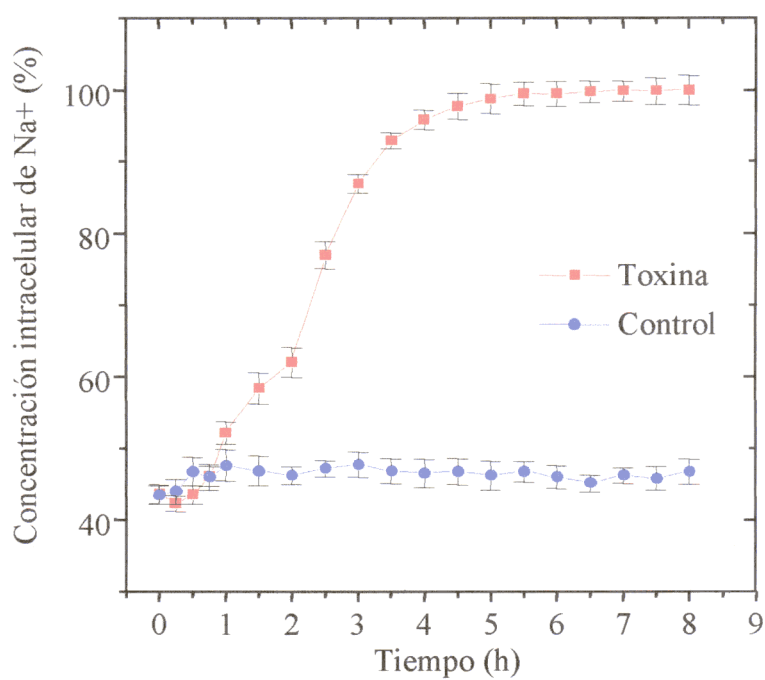


Figura 4.26.- Entrada de sodio al interior de las células de *C. boidinii* tratadas con toxina *killer* y con toxina *killer* inactivada (Control).

4.14.4.- Acción de la toxina sobre el pH intracelular.

El pH intracelular determinado para las células de *C. boidinii* en las condiciones de ensayo empleadas fue de 6.4 - 6.5 unidades de pH aproximadamente. Las células tratadas con toxina *killer* presentaron un pH intracelular sensiblemente inferior tras una hora de exposición a la toxina, aunque una pequeña disminución del mismo ya se pudo observar tras media hora de exposición (Figura 4.27). El pH final alcanzado en las células tratadas con la toxina fue de 4.6 - 4.7 unidades aproximadamente.

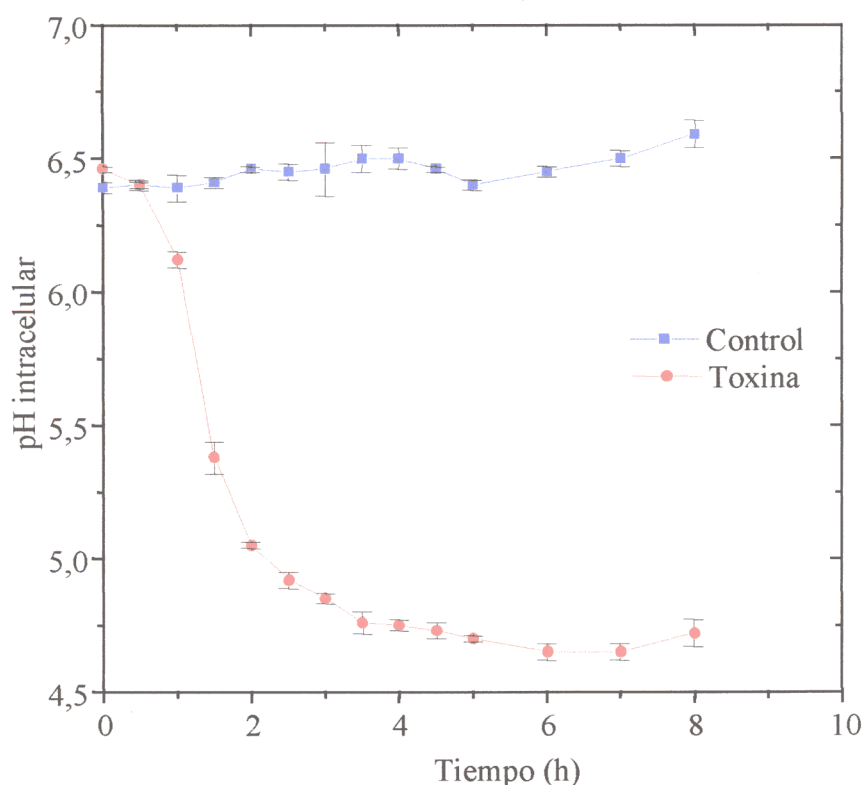


Figura 4.27.- Evolución del pH intracelular en las células sensibles tratadas con toxina *killer* y con toxina inactivada con calor (Control).

4.14.5.- Acción de la toxina sobre el ciclo celular.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo (Figuras 4.29a, 4.29b y 4.29c) muestran que la toxina no parece tener, en las condiciones testadas, ningún efecto específico sobre alguna fase concreta del ciclo celular. Se puede observar que la toxina *killer* no detiene el ciclo celular de las células sensibles en ninguna fase del ciclo en concreto (lo que daría lugar a la acumulación de las células en una determinada fase). Independientemente del tipo de células empleadas (en crecimiento exponencial o en fase estacionaria) la acción de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 parece detener el ciclo en la fase en la cual estuvieran las células en el momento de poner la toxina en contacto con las células sensibles. Analogamente se muestra la evolución del ciclo celular de las células sin tratamiento. La Figura 4.28. hace referencia a la región de células analizadas para determinar su contenido en ADN, las células excesivamente grandes por citometría (FSC) se descartaron por que pudiera tratarse de agregados celulares y no de células individualizadas que se requieren para este tipo de estudio.

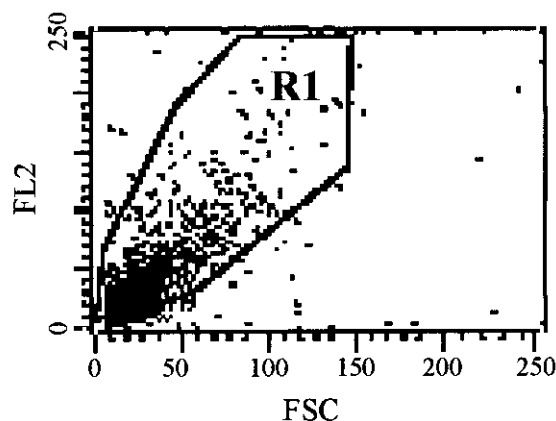


Figura 4.28.- Región acotada (R1) en la población celular (*C. boidinii*) analizada para la determinación de su contenido en ADN. Se han eliminado las células que por su tamaño excesivo pudieran ser agregados celulares. “FSC” (*Forward scatter*) hace referencia a la luz dispersada por las células que, a su vez, proporciona una idea del tamaño celular. “FL2” hace referencia a la fluorescencia emitida por las células teñidas con IP, siendo un reflejo del contenido en ADN.

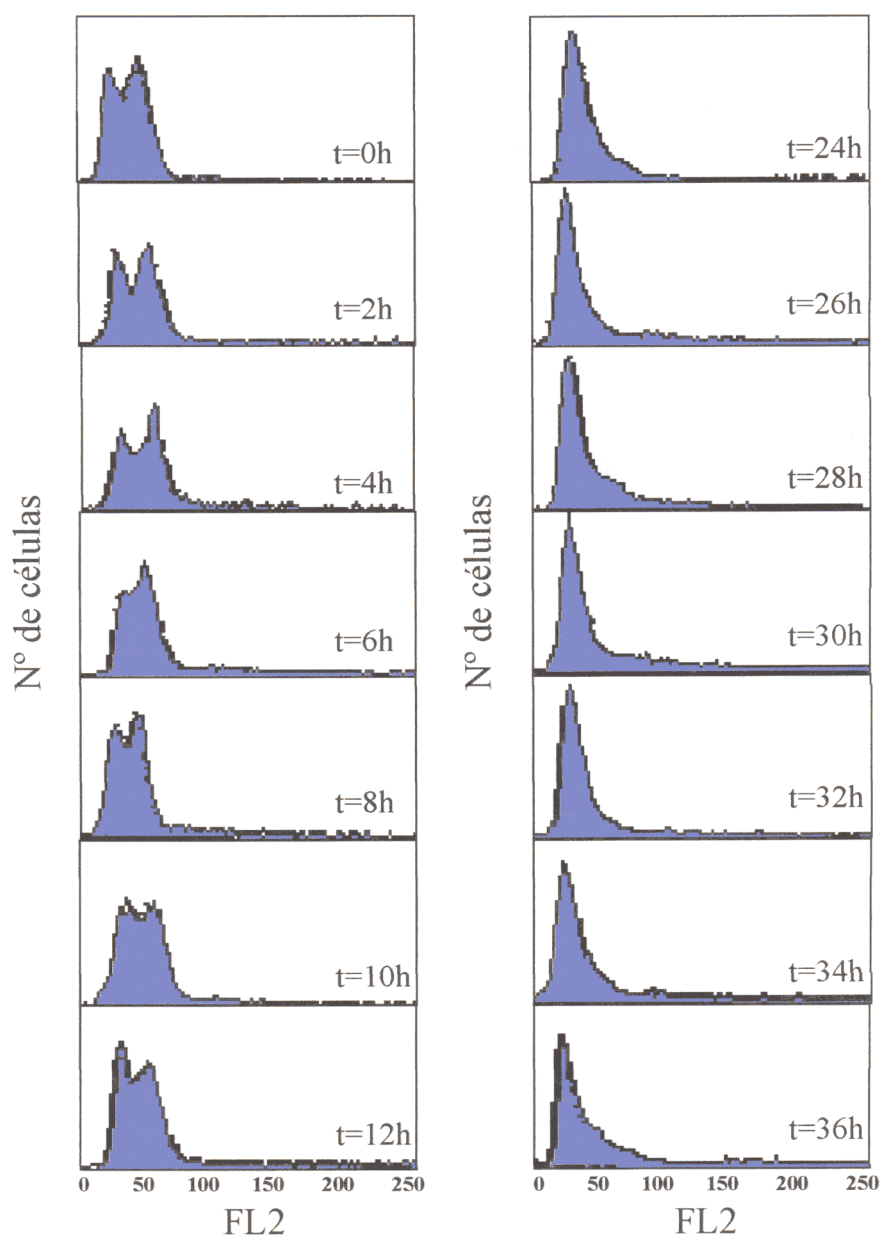


Figura 4.29a.- Cantidad de ADN de las células de *C. boidinii* creciendo en un cultivo control. De 0 a 12 horas se observan 2 picos de ADN característicos de células en fase exponencial de crecimiento. Las siguientes muestras presentan un solo pico con menor contenido en DNA, lo cual es indicativo de la existencia de una elevada proporción de células en fase estacionaria de crecimiento. “FL2” es la fluorescencia emitida por las células, indica el contenido relativo de ADN.

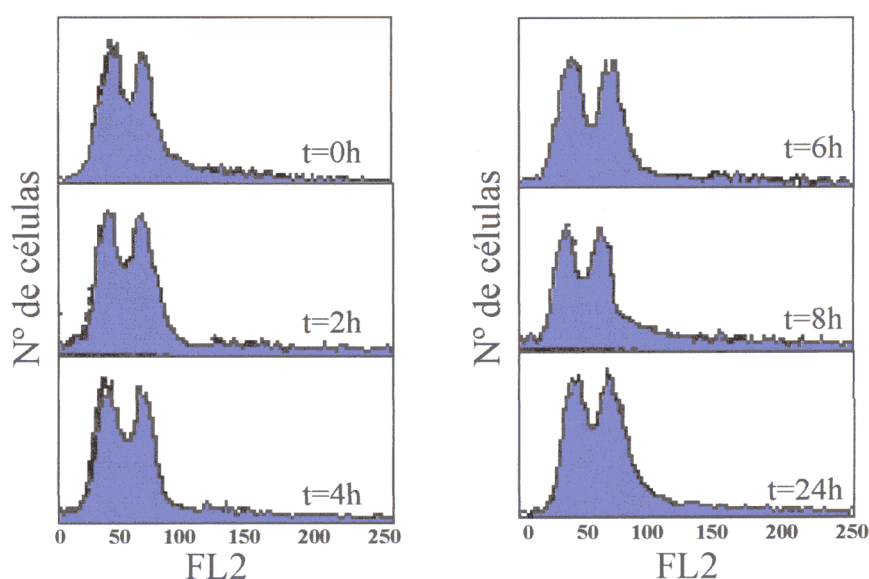


Figura 4.29b.- Cantidad de ADN presente en células de *C. boidinii* en fase exponencial de crecimiento tratadas con toxina *killer*. “FL2” hace referencia a la intensidad de fluorescencia emitida por las células. Se puede observar la existencia de dos picos referentes a dos cantidades de ADN (n y $2n$) que no cambian a lo largo del tiempo.

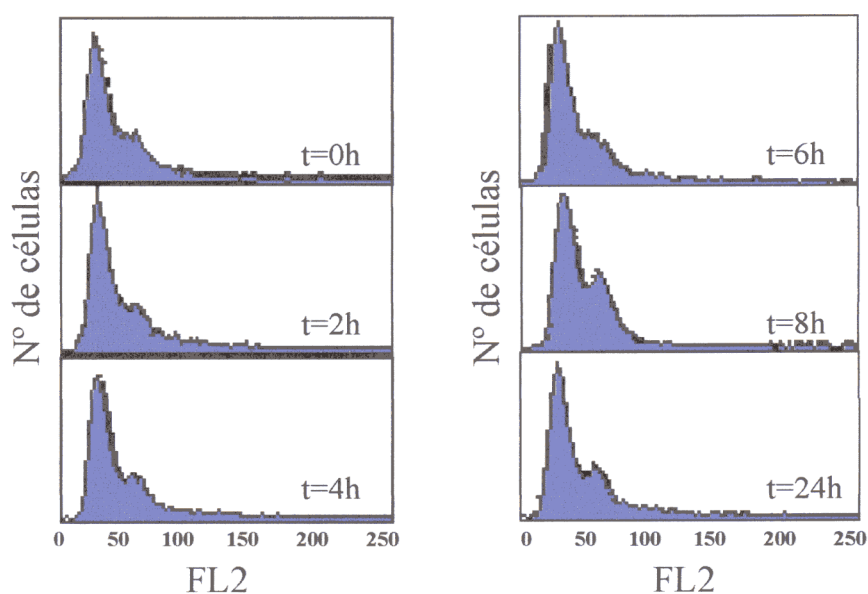


Figura 4.29c.- Cantidad de ADN presente en células de *C. boidinii* en fase estacionaria de crecimiento tratadas con toxina *killer*. “FL2” hace referencia a la intensidad de fluorescencia emitida por las células. Se puede observar la existencia de dos picos referentes a dos cantidades de ADN (n y $2n$) que no sufren cambios a lo largo del tiempo.

4.15.- Curación (eliminación) del carácter *killer*.

Para determinar la si existencia del carácter *killer* va ligado a la existencia de plásmidos (de RNA o DNA) comunmente se han empleado diferentes agentes físicos o químicos capaces de eliminar estos elementos de las células, transformándolas en cepas carentes de ese carácter. El empleo de cicloheximida, luz UV y diferentes temperaturas supraóptimas no permitió obtener ninguna cepa que hubiera perdido dicho carácter *killer*, por lo que la conclusión de esta experiencia sería que el factor *killer* codificado por *P. membranifaciens* CYC 1106 pudiera no estar codificado en plásmidos. Los tratamientos empleados pudieran no ser eficaces en retirar los plásmidos de las células, por lo que se investigó la existencia de plásmidos en la cepa *killer*. Como resultado de la extracción de los ácidos nucleicos de las células y su posterior electroforesis en geles de agarosa se pudo determinar la ausencia de plásmidos de RNA y DNA en esta cepa *killer* (Tabla 4.15).

Cicloheximida (mg/ml)	0.001	0.01	0.1	1.0	Temperatura (°C)	32	34	37	UV
	250/0	110/0	-	-		250/0	250/0	250/0	500/0

Tabla 4.15.- Tratamiento con distintos agentes físico-químicos para la eliminación de posibles plásmidos presentes en *P. membranifaciens* CYC 1106. Se indica el número de cepas testadas y debajo el número de cepas curadas, es decir sin carácter *killer*. (-): Ausencia de crecimiento tras 15 días.

V.- DISCUSSION

5.1.- Introducción.

El carácter *killer* fue descubierto por primera vez en *S. cerevisiae* por Makower & Bevan en 1963. Desde esa fecha ha sido posible identificar un gran número de cepas de diversas especies con esta propiedad (Golubev, 1998). Las toxinas producidas por las cepas *killer* ya descubiertas, en muchos casos no estudiadas en detalle, poseen características comunes en cuanto a su espectro de actividad y estabilidad a diferentes agentes físico-químicos, puntos isoeléctricos, masas moleculares, etc. Sin embargo, debido a la existencia de un amplio número de cepas *killer* descritas, se ha podido observar la existencia de ciertas levaduras cuyas toxinas *killer* presentan propiedades peculiares. Por ejemplo, la cepa *S. cerevisiae* 28 produce una toxina (KT28) que es capaz de soportar valores de pH y de temperatura muy superiores a lo considerado normal para la mayoría de las toxinas *killer* descritas. A este respecto, la toxina *killer* producida por *Pichia membranifaciens* CYC 1106, objeto de nuestro estudio, presenta también propiedades peculiares; dicha toxina sólo presenta actividad sobre ciertas cepas sensibles cuando en el medio en el que se detecta la actividad se ha incorporado NaCl. La presencia de concentraciones sucesivamente crecientes de NaCl aumentan la actividad de la toxina (Marquina *et al.*, 1992; Llorente *et al.*, 1997). La importancia de esta característica es mayor si tenemos en cuenta el hecho de que la sal es empleada de forma habitual en la fabricación de muchos alimentos susceptibles de ser contaminados y/o deteriorados por levaduras; levaduras que pudieran ser sensibles a la acción de la toxina. Esta importancia es mayor en el caso de alimentos que sufren un proceso de fermentación, por ejemplo aceitunas verdes, salsa de soja, etc. (Marquina *et al.*, 1992; Suzuki & Nikkuni, 1994).

En el presente trabajo se han estudiado las características que presenta la toxina *killer* de *Pichia membranifaciens* CYC 1106 sobre una cepa seleccionada por su elevada sensibilidad a dicha toxina en presencia de NaCl (*Candida boidinii* IGC 3430). Se ha estudiado la cinética de producción de toxina, así como su actividad y estabilidad a diferentes agentes físico-químicos. La optimización de la producción de toxina, su purificación y modo de acción en las células sensibles también han sido objeto de estudio en el presente trabajo.

5.2.- Cinética de la producción y optimización de la producción de toxina killer.

La cinética de producción de toxina fue estudiada en dos medios de cultivo diferentes, uno sintético (YNB) y otro complejo (YMB) (Figura 4.2). El crecimiento de *P. membranifaciens* en el medio YMB fue mejor, ya que presentó una tasa específica de crecimiento de 0.308 h^{-1} frente a 0.179 h^{-1} que presentó en medio YNB. El medio rico (YMB) presenta un elevado número de nutrientes como peptonas, extractos de levadura y malta que justifican este mejor crecimiento. El medio YNB, además de la fuente de carbono (glucosa), suministrada en ambos medios por igual, está compuesto de vitaminas y sales minerales que le hacen ser un medio más pobre en nutrientes. De la misma forma que el crecimiento, la producción de toxina *killer* fue mayor en el medio YMB. Este hecho ya ha sido observado anteriormente en la producción de toxinas *killer* por otras levaduras. Woods & Bevan (1968) han observado que el extracto de malta mejora la producción de toxina en *S. cerevisiae*. Según estos autores la adición de extracto de malta a un medio sintético incrementa la producción de forma significativa, suceso que ocurre de forma mucho menos significativa al añadir peptona, caseína o gelatina. Sin embargo, el empleo de gelatina en el medio de cultivo, según estos mismos autores, previene la inactivación de la toxina por agitación/aireación. Estos resultados son contradictorios en parte con los aportados por Middelbeek *et al.* en 1979 para la toxina de *P. kluyveri*, ya que según estos autores, tanto el extracto de levadura como la gelatina, mejoran la producción de toxina.

Pese a que el medio YMB aportó una producción de toxina mayor, la cinética de producción de la toxina en los dos medios empleados fue similar. Los resultados obtenidos para los dos medios muestran que la toxina *killer* de *P. membranifaciens* es producida durante la fase exponencial de crecimiento y continúa hasta el final de esta o principio de la fase estacionaria de crecimiento. Desde este momento los niveles de actividad *killer* en el medio disminuyen, debido probablemente a fenómenos de inactivación. Estos resultados están de acuerdo con los aportados por otros autores para las toxinas cuya producción ha sido estudiada: *S. cerevisiae* (Ouchi *et al.*, 1978; Palfrey & Bussey, 1979), *H. saturnus* (Ohta *et al.*, 1984) y *P. anomala* (Sawant *et al.*, 1988). Todas estas cepas secretan su toxina *killer* durante la fase exponencial de crecimiento, y al final de la misma, la actividad detectada comienza

a disminuir de forma más o menos acusada. La adición de glicerol (20%) al medio de cultivo (Ouchi *et al.*, 1978) impide esta disminución en la actividad. Wilson & Whittaker (1989) estudiando la producción de la toxina *killer* de *K. lactis* llegan a la conclusión de que esta disminución en la actividad tras el crecimiento es debida a una inactivación por agitación y puede ser paliada incrementando la cantidad de peptona o extracto de levadura que actuarían estabilizando la toxina.

El hecho de que la producción de toxina en fase exponencial no sea paralela en muchos casos al aumento en la biomasa, indica que la producción no es simplemente proporcional al crecimiento, o que las toxinas se inactivan con una tasa de inactivación que no es proporcional a su concentración en el medio (Palfree & Bussey, 1979).

Una vez determinada la cinética de producción de la toxina, el estudio se centró en optimizar la producción de la misma para así facilitar el proceso de purificación de la toxina. Puesto que la producción de la toxina acontece durante la fase exponencial de crecimiento y tras ella la actividad en el medio disminuye, las muestras para la determinación de la actividad se tomaron cuando la densidad óptica (D.O.) alcanzó el valor de 1.0, valor que, aproximadamente, coincide con el final de la fase exponencial. En una primera fase del estudio se estimó la producción en cinco medios de cultivo empleados para el crecimiento de levaduras (YMB, YPD, Gorodkowa modificado, YNB y medio K) (Tabla 4.1). Entre los medios estudiados la mayor actividad *killer* se detectó en los medios complejos (YMB, YPD y Gorodkowa). Los medios sintéticos produjeron menor actividad *killer*. Sin embargo, el medio YNB presentó una actividad específica mucho mayor que los otros medios. Puesto que para la purificación de una proteína es más importante seleccionar un medio en el cual la proporción de la proteína de interés sea lo mayor posible frente al resto de las proteínas del extracto, el medio YNB fue el medio seleccionado para continuar el estudio de mejora de la producción de toxina.

De este modo, el medio YNB se suplementó con varios aditivos para incrementar la actividad específica y se estudiaron diferentes condiciones de cultivo (pH, temperatura y agitación). Se emplearon detergentes (Triton X-100, Brij 58, Tween 80, etc), agentes

estabilizantes (glicerol, sorbitol), agentes caotrópicos/fuente de nitrógeno (urea) e inhibidores de proteasas (PMSF), todos ellos a tres concentraciones diferentes. El estudio realizado mostró que las condiciones físico-químicas óptimas fueron: temperatura de 20°C, pH 4.0 y agitación de 150 rpm (Tablas 4.2, 4.3 y 4.4; Figuras 4.3, 4.4, 4.5). Estas condiciones de cultivo son similares a las empleadas para la producción de otras toxinas *killer* (temperaturas próximas a 20°C, pH ácidos (entre 4.0 - 4.8) y agitación moderada o nula (Palfree & Bussey, 1979; Ouchi *et al.*, 1978; Middelbeek *et al.*, 1979; Schmitt & Radler, 1987; Suzuki *et al.*, 1989; Radler *et al.*, 1990; Kono & Himeno, 1997). Las tasas específicas de crecimiento determinadas en todas estas condiciones mostraron que las condiciones óptimas de crecimiento (30°C, pH 5.0 y 150 rpm) no son las más indicadas para la producción de toxina, ya que en estas condiciones no existe producción de toxina o la toxina producida queda inactivada.

El empleo de aditivos, fundamentalmente detergentes no iónicos, incrementó sensiblemente la producción de toxina *killer*; concretamente, Triton X-100, Tween 80 y fundamentalmente Brij 58 (Tablas 4.5a, 4.5b). Este último, a una concentración del 0.01%, incrementó la actividad específica hasta 2914.5 UA mg⁻¹ un 351% mayor que la actividad proporcionada por el medio base. Resultados similares en cuanto a la estimulación de la actividad han sido obtenidos por otros autores (Middelbeek *et al.*, 1979) para la toxina de *P. kluyveri*. Los resultados aportados por estos autores indican igualmente que el detergente Brij 58, así como el Triton X-100, son eficaces a la hora de mejorar la producción de toxina, incrementándola entre 2 y 3.5 veces respecto al control sin aditivos. Este resultado ha sido también observado estudiando la producción de celulasas en *Trichoderma reesei*, en este caso empleando Tween-80 (0.1 - 0.2%) (Gallo *et al.*, 1978; Ghose *et al.*, 1979). Sin embargo, otros autores no observan este mismo efecto en la producción de toxina *killer* en *P. anomala* empleando 0.01% de Tween 80 (Sawant *et al.*, 1988). Middelbeek *et al.*, (1979) proponen que estos agentes en realidad aumentarían la estabilidad de la toxina producida durante el crecimiento. Otra posibilidad sería que estos agentes podrían separar/extraer las proteínas adheridas a las propias paredes celulares. Como es sabido, la composición de las paredes de las diferentes levaduras es similar y ciertas toxinas *killer* poseen como receptores primarios ciertos componentes de las paredes de las células sensibles que se encuentran igualmente en las células productoras. Por tanto, es fácil asumir que la propia pared de la levadura *killer*

podría ser un reservorio de toxina. De hecho, los mutantes carentes de glucanos β -D-(1 \rightarrow 6) (receptor de pared de ciertas toxinas *killer*) en su pared celular, son cepas *superkiller*, es decir, son superproductoras de toxina.

Los agentes estabilizantes como glicerol y sorbitol no incrementaron la actividad de toxina *killer* tras el cultivo, a diferencia de lo descrito por algunos autores (Ouchi *et al.*, 1978). Ningún otro agente empleado incrementó de forma significativa la producción de toxina *killer* por *P. membranifaciens*. El inhibidor de proteasas (PMSF) que en ciertas cepas de *S. cerevisiae* (Tipper & Bostian, 1984) mejora la producción de toxina, ya que este agente impide que ciertas proteasas de la célula degraden la toxina, no mostró efectos significativos sobre la producción de toxina de *P. membranifaciens*.

5.3.- Naturaleza y características físico-químicas de la toxina *killer*.

Como inicio a la caracterización de la toxina, en primer lugar se demostró que la actividad *killer* de *P. membranifaciens* era debida a la acción de una proteína. La realización de esta experiencia previa a la caracterización de la toxina se hace necesaria dado que no toda inhibición en el crecimiento observada puede ser atribuida a la existencia de una toxina *killer* según observaciones detalladas por Golubev, 1988. En ciertos casos la inhibición causada por levaduras sobre ciertas levaduras e incluso hongos, protozoos y bacterias no es debida a la acción de una toxina *killer* sino a la acción de ciertos ácidos orgánicos, cambios del pH del medio, etc. Concretamente, la inhibición del crecimiento en levaduras es debido a veces a la acción de feromonas implicadas en los procesos de conjugación. Existe además, el caso de *Metschnikowia pulcherrima* cuyos aislamientos presentan una amplia actividad zimocida, estando dicha actividad asociada a la producción de ácido pulquerrimínico, que posee la capacidad de quelar hierro. Por tanto para discernir su naturaleza, la toxina se incubó en presencia de tres proteasas diferentes (pronasa, pepsina y papaína) (Tabla 4.6). La pepsina no se mostró activa frente a la toxina que permaneció con un 100% de actividad tras el proceso. Papaína y pronasa disminuyeron considerablemente la actividad, aunque en diferente grado. La disminución en la actividad *killer* debida a la acción de proteasas indica la naturaleza proteica de esta toxina. Este tipo de abordaje ha sido empleado por Radler *et al.*, 1993; Kono

& Himeno, 1997 para demostrar la naturaleza proteica de las toxinas en estudio. De la misma forma Young & Yagiu (1978) emplean el tratamiento con proteasas sobre diferentes toxinas para establecer diferencias entre ellas. En desacuerdo con nuestros resultados estos autores encuentran que las proteasas papaína y pronasa no afectan a la actividad *killer* de una cepa de *P. membranifaciens* la NCYC 333 (*National Collection of Yeast Cultures*).

Determinada la naturaleza proteica de la toxina producida por *P. membranifaciens* CYC 1106 se estudiaron las propiedades de la misma. El rango de temperaturas en las que la actividad de la toxina *killer* fue óptima estuvo comprendido entre 5 y 20°C. Valores de temperatura superiores produjeron una disminución considerable en la actividad. Resultados similares se observan al estudiar la estabilidad de la toxina a la temperatura (Figura 4.6). La temperatura óptima, así como la estabilidad a la misma, fue similar a la de otras toxinas *killer*. El conjunto de toxinas *killer* estudiadas presentan temperaturas óptimas de actividad y estabilidad inferiores a los 20°C - 30°C. Existen excepciones, como la toxina de *Hansenula saturnus* que es estable a 100°C durante 10 minutos, aunque en general se puede hablar de una elevada sensibilidad a la temperatura. La diferente metodología para determinar la actividad y estabilidad al pH y a la temperatura de las toxinas *killer* hace difícil la comparación entre ellas. Las toxinas de tipo K1 (*S. cerevisiae*) son inactivadas rápidamente, un 50% en 20 - 30 min a 30°C, las toxinas de tipo K2 (*S. cerevisiae*) son algo más estables a la temperatura, pierden un 50% de actividad a 30°C en 30-37 minutos y la toxina KT28 (*S. cerevisiae*) es más estable que la mayor parte de las toxinas *killer* ya que no es afectada a 40°C durante 1 hora (Pfeiffer & Radler, 1982). Otras muchas toxinas estudiadas, producidas por: *S. capensis* NCYC 761, *D. vanrijii* NCYC 577, *H. anomala* NCYC 434 y 435, *H. subpelliculosa* NCYC 16, *H. mrakii* NCYC 500, *K. fragilis* NCYC 587, presentan un 50% de inactivación a 35°C en tiempos que van de los 10 a los 70 minutos de incubación (Young & Yagiu, 1978). La toxina *killer* de *Z. bailii* 412 (KT412) presenta una estabilidad similar, un 50% a 37°C durante 1 hora. La toxina *killer* de *C. crusei* 392 es estable a 40°C al igual que la de *P. fermentans* 394 y 395 (Pfeiffer & Radler, 1984).

La toxina *killer* más estable a la temperatura de las descritas es la producida por *H. saturnus* (Ohta *et al.*, 1984), esta toxina es 100% estable durante 1 hora a 60°C y durante 10

minutos a 100°C. Existe otra toxina, la producida por *K. waltii* IFO 1666T, capaz de resistir tratamientos térmicos a 100°C durante 10 minutos, pero cuya caracterización no ha sido realizada de forma extensiva (Kono & Himeno, 1997).

El estudio de la estabilidad y actividad de la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106 frente al pH mostró que la toxina estudiada presenta un pH óptimo de actividad por debajo de pH 4.8 y un 100% de estabilidad por debajo de pH 5.0 (Figura 4.7). Variaciones de pH por encima de estos valores redujeron rápidamente tanto actividad como estabilidad. De este modo, la toxina presenta un comportamiento similar a un gran número de toxinas *killer* caracterizadas. Las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas (Young & Yagiu, 1978; Pfeiffer & Radler, 1984; Pfeiffer & Radler, 1982) presentan igualmente factores *killer* con pH óptimos de actividad ácidos, 4.7 para las cepas K1, 4.2-4.4 para las cepas K2 y 5.8 para la cepa productora de la toxina KT28. Otras cepas *killer* presentan pH óptimos de actividad similares: *P. fermentans* 394 y 395 (4.2), *P. kluyveri* (2.5-4.7), *C. crusei* 392 y 393 (4.2), *K. lactis* NRRL 161 (4.5), etc. Otras presentan actividad óptima a pH más elevados: *P. acaciae* (7.0-7.5) (McCracken *et al.*, 1994).

La estabilidad al pH de las toxinas *killer*, en general, está también comprendida en un estrecho margen de valores de pH; la mayoría entre 2.0 y 5.0. En este rango de pH presentan estabilidad las toxinas producidas por la mayor parte de las cepas de *S. cerevisiae*, así como otras muchas cepas (*D. vanriji*, *H. anomala*, *H. subpelliculosa*, *Z. bailii*, etc). Otras toxinas, de modo general las mismas que para la temperatura, presentan estabilidad a valores de pH inusualmente elevados: *H. mrakii* (4.0-11.0) (Ashida *et al.*, 1983), *H. saturnus* (2.0-11.0) (Ohta *et al.*, 1984; Komiyama *et al.*, 1995).

Debido a que la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 presenta la característica de ser activa sólo en presencia de NaCl y KCl (Figura 4.8), y a que dicha cepa se aisló de un ambiente salino moderado (fermentación de aceitunas verdes), se estudió cómo la presencia de la sal podría afectar a la estabilidad a la temperatura y al pH. La incubación de la toxina a diferentes temperaturas (20, 25, 30 y 35°C) en presencia de concentraciones de NaCl del 3 y 6% (p/v), en contra de lo esperado, produjo una disminución en la estabilidad

de la toxina (Figura 4.9). Del mismo modo, este efecto fue observado al incubar la toxina a diferentes valores de pH en presencia de sal (Figura 4.10); un 6% de NaCl a pH 4.8 causó una pérdida de estabilidad del 100% en dos días de incubación, cuando en ausencia de sal, la toxina muestra un 100% de estabilidad durante 5 días de incubación a este valor de pH. Palfree & Bussey, (1979) describen este mismo efecto en una toxina *killer* de *S. cerevisiae*, el aumento de la concentración de NaCl de 0.1 M a 0.8 M produjo una reducción en la estabilidad de 3.7 veces (6% (p/v) aprox. 1.0 M). La diferencia entre ambos casos reside en que la toxina de *S. cerevisiae* no necesita NaCl para mostrar su actividad *killer* a diferencia de la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106. Por tanto, a los valores de pH ensayados (próximos o en valores de pH de cierta inestabilidad en ausencia de NaCl (4.8 - 6.0)) el NaCl, lejos de tener un efecto estabilizante, produce una mayor inestabilización. En el caso de la temperatura el efecto del NaCl pudo ser observado a temperaturas óptimas (20°C) y subóptimas (25, 30 y 35°C), sin embargo, fue un efecto menos importante que el observado al cambiar el valor de pH.

Se han descrito otras toxinas con la característica de presentar actividad sólo en presencia de NaCl y KCl (*Salt Mediated Toxins*). Las toxinas de *D. hansenii* (Gunge *et al.*, 1993) y *P. farinosa* (Suzuki *et al.*, 1989), dos levaduras halotolerantes, muestran mayor actividad a concentraciones de NaCl sucesivamente crecientes, hasta valores de 2 M NaCl para *P. farinosa*. La mayor actividad de estas toxinas en presencia de sal, incluida la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106, se ha demostrado que no es debida a una mayor producción por parte de la levadura *killer* en estas condiciones (Llorente *et al.*, 1997), ni a cambios en la estructura secundaria de las toxinas (Suzuki *et al.*, 1997), sino a un aumento en la sensibilidad de las levaduras testadas. De forma similar a la toxina de *P. membranifaciens*, la toxina de *P. farinosa* pierde actividad drásticamente cuando el pH es superior a 5.0. Se ha demostrado que la pérdida de actividad de esta toxina es debida a la disociación de las dos subunidades que la forman en presencia de estos valores de pH. Procesos similares, pese a ser una proteína monomérica, pudieran estar afectando a la estabilidad de la toxina de *P. membranifaciens* al cambiar las variables físico-químicas del medio. Estudios bioquímicos de la estructura secundaria de la toxina (dicroísmo circular, etc) serían necesarios para profundizar en el conocimiento de las causas que producen la pérdida de estabilidad de la toxina en presencia

de NaCl a ciertos valores de pH sub-óptimos.

La determinación de ciertas características físico-químicas como la masa molecular, punto isoeléctrico y glicosilación sólo se pudieron conocer una vez purificada la toxina *killer*, estas características son discutidas a continuación, aunque el proceso de purificación necesario para su determinación se comenta en detalle más adelante.

El valor de Rf de la toxina *killer* calculado en electroforesis desnaturalizante en geles del 12% de poliacrilamida fue de 0.63 (Figura 4.14). Este valor interpolado en una recta patrón construida con diferentes proteínas de masas moleculares conocidas proporcionó un valor de masa molecular de 18000 Da. Como se refleja en el apartado de Introducción (Tablas 1.4 y 1.5) este valor de masa molecular puede ser considerado como habitual entre el conjunto de toxinas *killer* caracterizadas. La determinación de la presencia de carbohidratos en la toxina se realizó por el método PAS (ácido periódico - reactivo de Schiff). No se pudo observar, con esta tinción, la aparición de la banda de proteína correspondiente a la toxina, por lo que, empleando esta técnica se descartó la posibilidad de que dicha toxina fuese una glicoproteína. La técnica de tinción PAS tiene una sensibilidad baja y para proteínas poco glicosiladas puede ofrecer resultados negativos pese a cargarse cantidades elevadas de proteína en las electroforesis. La presencia de glicosilación se ha demostrado que hace a las proteínas más resistentes a la acción de proteasas y de agentes como pH y temperatura. La sensibilidad de la toxina *killer* a estos agentes pudiera estar relacionada en parte con la ausencia de glicosilación, aunque se han descrito casos como la toxina de *H. saturnus* que pese a no estar glicosilada presenta una estabilidad muy superior.

El punto isoeléctrico (PI) calculado en isoelectroenfoque analítico para la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 fue de 3.91 unidades de pH (Figura 4.15). Los PI calculados para otras toxinas *killer* son siempre ácidos. El PI más elevado ha sido descrito en *H. saturnus* que como ya se ha comentado posee características algo diferentes del resto de toxinas *killer*. En el género *Pichia*, los PI descritos oscilan entre 3.8 y 4.3 (Tablas 1.4 y 1.5).

Atendiendo a todas las características físico-químicas descritas podemos decir que la

toxina de *P. membranifaciens* posee propiedades similares al conjunto de todas ellas. Sólo cabe destacar el hecho característico de esta toxina de presentar actividad sobre *C. boidinii* cuando están presentes determinadas concentraciones de NaCl/KCl. Cabe destacar la gran similitud entre las características de la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106 y la toxina producida por *P. kluyveri*, su masa molecular es muy similar (18000 y 19000), número de subunidades (1), su PI (3.91 y 4.3) y codificación genética (cromosómica).

5.4.- Proceso de purificación de la toxina killer de *P. membranifaciens*.

Tras el estudio de la producción de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 en diferentes medios suplementados, se optó por la utilización del medio YNB suplementado con Brij 58, por ser este el medio que presentó una actividad específica mayor, como ya se ha comentado en el apartado 5.1. El volumen inicial empleado fue de 3 litros de cultivo, razón por la cual, como primer paso del proceso de purificación tras el cultivo, se optó por un proceso de concentración del sobrenadante obtenido. Este proceso se realizó por ultrafiltración tangencial hasta obtener un volumen de aproximadamente 75 ml, empleando filtros de 10 kDa de diámetro de poro. Así, en este proceso el sobrenadante extracelular se concentró 40 veces, obteniendo un grado de purificación de 5.0 veces (Tabla 4.7). En este paso el rendimiento obtenido puede considerarse bajo, ya que un 50% de pérdida de actividad en el primer paso de purificación es una pérdida considerable, pese a que a la solución se añadió glicerol como estabilizante. Sin embargo, pérdidas de actividad en los procesos de ultraconcentración son habituales en la purificación de toxinas *killer*; Radler *et al.*, (1990) en la purificación de la toxina *killer* de *Hanseniospora uvarum* obtienen un 44% de rendimiento en este proceso para un grado de purificación de 6.5 veces.

Una vez concentradas las proteínas por ultrafiltración se realizó una precipitación fraccionada de proteínas. Se ensayaron diferentes agentes capaces de precipitar proteínas en diferentes concentraciones (etanol, acetona y sulfato amónico). El mejor rendimiento se obtuvo con el etanol y dentro de las concentraciones de etanol ensayadas, el etanol al 45% seguido de una precipitación al 75% fue el proceso que dio mejores resultados. El grado de purificación en este proceso fue de 31.2 veces con un rendimiento del 42%.

Tras precipitar las proteínas con etanol se ensayaron diferentes técnicas y soportes cromatográficos, intercambio iónico (Sepharsa S), hidrofobicidad (Ultrapore C3), exclusión molecular (Sephadex G-75, G-100, G-200, Biogel P-200), afinidad (Con-A-Sepharsa, Sepharsa 6B-epoxi- β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano). Sólo la técnica reseñada en último lugar resultó ser efectiva en el proceso de purificación de la toxina *killer* tras la realización de un isoelectroenfoque preparativo en Ultrodex. Las técnicas cromatográficas empleadas, excepto la reseñada, no fueron eficaces en la purificación, muy probablemente debido a la tendencia de las toxinas *killer* a formar agregados con proteínas y carbohidratos del medio. Este hecho condujo a algunos autores a caracterizar toxinas *killer* con masas moleculares muy elevadas ($2 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$) (Bussey, 1972) que posteriormente han sido purificadas y caracterizadas, teniendo en realidad masas moleculares muy inferiores. La formación de agregados conduce a confusiones ya que la actividad *killer* queda excluida de las columnas de filtración molecular (Sephadex G-100, etc) indicando masas moleculares muy superiores a las reales (Middelbeck *et al.*, 1979). Probablemente, debido a este problema los soportes cromatográficos ensayados no permitieron la obtención de resultados satisfactorios, por lo que se empleó otra técnica diferente de purificación basada en la separación de las proteínas por sus puntos isoelectrónicos. El isoelectroenfoque preparativo (Figura 4.12) se realizó en una matriz (Ultrodex) que permite la rápida extracción de las proteínas una vez realizado el isoelectroenfoque. Se ensayaron diferentes intervalos de pH en los isoelectroenfocos (3-10, 2.5-5, etc), pero una vez determinado el punto isoelectrico aproximado de la toxina (en torno a 3.9) se empleó de forma rutinaria el intervalo de pH más estrecho posible (entre los disponibles comercialmente) dentro de ese rango cercano a 4.0 (2.5-5.0). Esta técnica permitió la obtención de un elevado grado de purificación (102.3), resultado que se obtiene comúnmente con este tipo de técnica ya que habitualmente se emplea para la separación de proteínas muy parecidas entre si (isoenzimas). El rendimiento de las fracciones recogidas del isoelectroenfoque y posteriormente reunidas fue del 25%. Del análisis de la cantidad de proteínas existente en el extracto sometido a isoelectroenfoque se observa que un gran número de proteínas presentan puntos isoelectrónicos ácidos, lo que hizo imposible obtener la toxina purificada a homogeneidad tras este proceso. Por esta razón, las fracciones recogidas se dializaron frente a tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 3.5 con 15% de glicerol como agente estabilizante, y se sometieron a cromatografía de afinidad (Sepharsa 6B-epoxi- β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano) (Figura 4.13). Este tipo de cromatografía

se pudo realizar aprovechando la actividad biológica de la propia toxina *killer*.

Debido a la dificultad de la purificación de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 por las técnicas cromatográficas clásicas, el procedimiento empleado para la purificación fue desarrollado una vez se hubo conocido la naturaleza del receptor primario de la toxina en la levadura sensible *C. boidinii* IGC 3430. El procedimiento de purificación por cromatografía de afinidad fue el descrito por Hutchins & Bussey en 1983 y Schmitt & Radler en 1987, con pequeñas modificaciones para adaptar la técnica a las características de estabilidad y actividad de la toxina de *P. membranifaciens*. Son varios los autores que han realizado la purificación de alguna toxina *killer* basándose en esta metodología (Hutchins & Bussey, 1983; Schmitt & Radler, 1987; Schmitt & Radler, 1989). La técnica consiste en unir el receptor purificado de la toxina a una matriz de cromatografía previamente activada. Según la naturaleza del receptor la matriz debe ser activada de un modo u otro. Así, Schmitt & Radler, 1987 y 1989, han purificado la toxina KT28 de *S. cerevisiae* de dos formas distintas atendiendo a la naturaleza del receptor primario de esta toxina (manoproteína). La primera de ellas con una matriz (Sepharosa 4B) activada con CNBr, de forma que es capaz de unirse a la parte proteica del receptor y, la segunda, uniendo el receptor primario por su parte glucídica a una matriz (Sepharosa 6B) epoxi-activada. Debido a la naturaleza del receptor primario o de pared para la toxina de *P. membranifaciens* (β -D-(1 \rightarrow 6)-glucano) la matriz empleada para la purificación fue la Sepharosa 6B epoxi-activada. La matriz activada, obtenida comercialmente, se unió al receptor primario purificado y se empleó como último paso en el proceso de purificación.

Las fracciones con mayor actividad específica obtenidas en el isoelectroenfoco analítico se juntaron y se cargaron en la columna de cromatografía de afinidad. Sólo fue posible eluir la actividad *killer* retenida en la columna cambiando el pH del tampón de cromatografía hasta un valor de 5.0 en presencia de NaCl 1.5 M. Debido a la inestabilidad que presenta la toxina en estas condiciones de pH y salinidad, el proceso se realizó en presencia de 15% de glicerol, además, las fracciones recogidas de la cromatografía se ajustaron rápidamente a pH 4.0 para evitar la pérdida de actividad. Los tampones empleados habitualmente por otros autores para eluir otras toxinas *killer* de estos soportes (Tris 0.1 M, pH 7.5; citrato 0.01 M, pH 6.5) no han podido ser empleados a causa de la inestabilidad de

la toxina a esos valores de pH. En las condiciones de elución comentadas se obtuvo un sólo pico de actividad y proteína, que al analizar su pureza por electroforesis se obtuvo una sola banda en condiciones nativas y desnaturalizantes. El rendimiento final del proceso de purificación fue bajo, un 10%, con un factor de purificación de 124.5 veces (Tabla 4.7). Este rendimiento es menor de lo habitual (40% - 80%) en la purificación de toxinas *killer*, aunque otros autores han obtenido valores similares, como ejemplo, Radler *et al.*, 1990, en la purificación de la toxina de *Hanseniaspora uvarum*, o menores, como el rendimiento del 4% en la purificación de la toxina de *P. acaciae* obtenido por McCracken *et al.*, 1994.

5.5.- Experiencias de curación (eliminación) del factor *killer*.

La obtención de cepas "curadas" a partir de cepas *killer* ha sido uno de los abordajes más empleados para conocer información sobre la localización de la información que codifica para las toxinas. El empleo de ciertos tratamientos físicos y químicos (temperatura, luz UV, cicloheximida, etc) permite eliminar de las células los elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos); que en ciertos casos, son poseedores de la información genética para la toxina (Fink & Styles, 1972; Wickner, 1976; Niwa *et al.*, 1981; Gunge, 1983; Sugisaki *et al.*, 1985). De este modo se han podido conocer múltiples casos de toxinas codificadas en plásmidos (K1, K2, K3, KT28, toxina de *K. lactis*, *Z. bailii*, etc) (Mitchell *et al.*, 1973; Gunge *et al.*, 1981, 1982; De Louvencourt *et al.*, 1983). Dentro del género *Pichia* se han encontrado toxinas codificadas en plásmidos (*P. acaciae* y *P. inositovora*) y codificadas en cromosomas (*P. farinosa*, *P. kluyveri*, *H. mrakii* y *H. saturnus*). Existen además toxinas codificadas en plásmidos de DNA y en plásmidos de RNA. Todas las toxinas del género *Pichia* cuyo carácter *killer* es plasmídico presentan dicho carácter en plásmidos de DNA. Para determinar si el carácter *killer* de *P. membranifaciens* estaba codificado en plásmidos se incubó dicha cepa en presencia de elevadas temperaturas (32, 34 y 37°C), cicloheximida y luz UV. De los tratamientos empleados no se pudo obtener ninguna cepa que hubiese perdido su carácter *killer*, por lo que esta evidencia hacía pensar en una codificación cromosómica. Que los tratamientos empleados no fueran capaces de generar cepas curadas pudiera ser debido a que la codificación de la toxina fuese cromosómica o por ineficacia de estos tratamientos en retirar los plásmidos, por lo que se investigó la existencia de estos en las células. Se realizó la

extracción de DNA y RNA de las células de *P. membranifaciens* y se realizaron electroforesis de agarosa. Los resultados muestran la ausencia de plásmidos de DNA y RNA por lo que la toxina probablemente se encuentre codificada en cromosomas. Resultados similares han sido obtenidos por Gunge *et al.*, 1981 empleando otra cepa de *P. membranifaciens* IFO 0864.

5.6.- Caracterización del receptor de pared en *C. boidinii* para la toxina killer de *P. membranifaciens*.

El papel de los polisacáridos de la superficie celular de las células eucariotas como receptores de ciertas proteínas es un hecho conocido, pero a la vez son muchos los detalles de estas interacciones que se ignoran. Dichos polisacáridos actúan como receptores de bacterias, virus y toxinas, pero además, están implicados en muchos tipos de interacciones celulares como la conjugación.

En un intento de determinar la presencia de receptores para la toxina killer de *P. membranifaciens* CYC 1106 en la pared celular de *C. boidinii* IGC 3430, se aislaron paredes celulares de esta levadura (Fleet & Phaff, 1973) y se realizó un fraccionamiento químico de las mismas para separar sus componentes principales. De acuerdo con los resultados obtenidos, la pared celular de *C. boidinii* supone aproximadamente un 21% del peso seco total de la levadura, porcentaje similar al obtenido para el conjunto de las levaduras (15-25%) (Fleet, 1991).

El proceso de fraccionamiento de las paredes celulares se realizó en tres fases diferentes que se pueden agrupar, con alguna excepción, en: la extracción de glucanos, la extracción de manoproteínas y la extracción de quitina. En la extracción de glucanos se obtuvieron cuatro fracciones según su diferente solubilidad en álcali y en ácido, denominadas S-1, S-2, P-1 y P-2. Por la metodología empleada, y de acuerdo con las observaciones de otros autores (Yu *et al.*, 1967; Manners *et al.*, 1973a; Manners *et al.*, 1973b; Manners *et al.*, 1974; Fleet & Manners, 1976; Sietsma & Wessels, 1981; Duffus *et al.*, 1982; Elorza *et al.*, 1983; Gopal, *et al.*, 1984; Elorza, *et al.*, 1985; Fleet, 1991; Shibata *et al.*, 1995), las fracciones obtenidas debieran corresponder a los siguientes componentes : S-1 (manoproteínas), S-2 (β -

(1→3)-glucanos), P-1 (β -(1→6)-glucanos) y P-2 (β -(1→3)-glucanos). La fracción S-1 no está formada por glucanos pero debido a que su aislamiento se realiza paralelamente a la de los glucanos se incluye en el proceso de aislamiento de estos. Esta subfracción S-1 difiere en composición a la fracción de manoproteínas obtenida por el método de Schmitt & Radler (1987). Este método es menos drástico que el empleado para glucanos y permite obtener las manoproteínas sin la pérdida de restos oligosacáridos. Las fracciones S-2 y P-2 corresponden a glucanos de tipo β -(1→3), pero de diferente naturaleza debido a su diferente solubilidad (Tabla 4.8).

El conjunto de las fracciones correspondientes a glucanos (S-2, P-1 y P-2) sumaron el 64.2% del total del peso seco de la pared. Valor semejante al obtenido por Fleet & Manners (1976) para *S. cerevisiae* (60%). El porcentaje de manoproteínas (15.5%) obtenido por precipitación con reactivo de Fehling (fracción S-1) fue algo inferior al descrito por estos mismos autores empleando este método (20%). Sin embargo, el contenido de manoproteínas en *S. cerevisiae* (25 - 50%) es superior al encontrado en ciertas especies del género *Candida* (10 - 20%) (Fleet, 1991), por lo que la comparación pudiera no ser válida. En el otro método empleado en la extracción de manoproteínas el rendimiento obtenido fue del 10%, un 5.5% inferior al método de la precipitación con reactivo de Fehling. La fracción correspondiente a quitina fue tan sólo un 1.95% de la pared de *C. boidinii*. Valores similares han sido obtenidos por otros autores, ya que el contenido en quitina, salvo excepciones, es pequeño en levaduras (0.6 - 9% en *C. albicans*); encontrándose la mayor parte acumulada en las cicatrices de gemación (Fleet, 1991).

Una vez se hubieron aislado todos los componentes principales de la pared se determinó cual o cuales pudieran estar actuando como receptores de la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106. La incubación de la toxina en presencia de las diferentes fracciones permitió observar que sólo las fracciones P-1 y P-2 presentaban capacidad de retener la actividad de la toxina (4.16). Ninguna de las fracciones correspondientes, en principio, al grupo de las manoproteínas presentó dicha capacidad. Atendiendo a estos resultados los glucanos, de un tipo u otro, serían los receptores para la toxina en la pared de *C. boidinii*. Suponiendo la existencia de un sólo tipo de receptor en la pared de la levadura,

estos resultados también indicarían la presencia mayoritaria de este receptor en la fracción P-1 por ser esta la fracción que es capaz de retener la actividad *killer* de una forma más eficaz. La presencia en la fracción P-2 de cierta capacidad de retener la toxina podría deberse a una separación incompleta de los diferentes tipos de glucanos durante el proceso de extracción, ya que ambas fracciones se obtienen de forma paralela a partir de los glucanos no solubles en álcali. Experiencias similares de competitividad han sido descritas por varios autores (Hutchins & Bussey, 1983; Bussey *et al.*, 1979) para determinar la adsorción de diferentes toxinas a ciertas fracciones de pared, células completas u otros sustratos (Radler & Schmitt, 1987). Relacionados con estos estudios se realizaron otros para determinar la especificidad de la adsorción toxina-receptor de pared. Se estudió si otras proteínas pudieran ser adsorbidas por las fracciones P-1, para ello se incubó dicha fracción en presencia de albúmina de suero bovino. La disminución en la cantidad de proteína se realizó mediante valoración por el método de Bradford. Los resultados (Tabla 4.9) muestran que la adsorción es selectiva ya que una proteína no relacionada con la toxina no es retenida por la fracción P-1. Análogamente se realizó una experiencia similar con la toxina *killer* (Tabla 4.10). Dicha toxina se puso en contacto con glucanos de diferente naturaleza y se determinó la adsorción de la toxina a los mismos. Sólo los polisacáridos de tipo β -(1 \rightarrow 6) (pustulano y un glucano aislado de *P. allahabadense*) fueron capaces de simular la acción de las fracciones P-1 y P-2, de la misma forma que las observaciones aportadas por Hutchins & Bussey en 1983.

Hutchins & Bussey (1983) describen la adsorción de una de las toxinas de *S. cerevisiae*. La presencia de glucanos de tipo β -(1 \rightarrow 6) produjo un aumento del número de supervivientes al ser tratados con toxina; lo que demostró la existencia de competitividad entre los receptores de pared de las células sensibles y los glucanos. A estos estudios se han sumado los realizados por Schmitt & Radler en 1987 y 1988 para la toxina KT28 de *S. cerevisiae*. En este caso, los receptores detectados para esta toxina en la pared de las células sensibles han sido las manoproteínas de la misma. En un caso y otro, estas dos toxinas de *S. cerevisiae* han podido ser purificadas aprovechando las propiedades biológicas de las mismas. El desarrollo de cromatografías de afinidad empleando los receptores de pared unidos a ciertos tipos de soportes cromatográficos (Sepharosa-4B y 6B) ha permitido la purificación de una forma rápida. De acuerdo con estos resultados, y debido a la imposibilidad de realizar la purificación

por las técnicas cromatográficas clásicas, se optó por emplear esta técnica para el desarrollo de un protocolo de purificación. Los resultados de esta experiencia ya se han comentado en un apartado anterior (5.4).

De acuerdo con el protocolo de extracción utilizado, la fracción P-1 de la pared de *C. boidinii* debería estar formada en su mayor parte de glucanos de tipo β -(1 \rightarrow 6). El hecho de que esta fracción fuese la más eficiente a la hora de retener la actividad *killer* puede indicar que fuesen estos los receptores de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 en la pared de la célula sensible. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos para otras toxinas *killer* (*S. cerevisiae* K1, K2 y K3, *H. uvarum*, etc). Este tipo de glucanos de la pared parecen ser los receptores de una gran parte de las toxinas *killer* descritas hasta el momento, aunque como ya se mencionó en el apartado de Introducción existen otros receptores descritos: manoproteínas (*S. cerevisiae* KT28), quitina (*K. lactis*), β -(1 \rightarrow 3) ó β -(1 \rightarrow 6) (*H. mrakii*) (Takita & Castilho-Valavicius, 1993; Kasahara *et al.*, 1994). El método empleado para la extracción de los glucanos P-1 y P-2 no es razón suficiente para determinar la naturaleza de dichas fracciones, por lo cual, se realizó el estudio químico y estructural de dichas fracciones.

En primer lugar, las fracciones obtenidas se trataron con metaperiodato sódico para determinar en que grado la adsorción de las toxinas a las fracciones estaba relacionada con su naturaleza química (Figura 4.17). El tratamiento con periodato disminuyó considerablemente la adsorción de la toxina a las fracciones y al pustulano (control), indicando que en la adsorción de la toxina a las fracciones no están implicados ningún tipo de glucanos β -(1 \rightarrow 3) o cualquier otro resistente a la acción del periodato como la quitina. El periodato, como es sabido, rompe los anillos de glucosa cuando existen dos o más grupos hidroxilo contiguos. Por esta razón los glucanos con enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 3) son resistentes a su acción. Resultados similares se muestran en Al-Aidroos & Bussey (1978) y en Hutchins & Bussey (1983).

El análisis químico de las fracciones P-1 y P-2 se realizó analizando por GLC los productos resultantes de la hidrólisis química con ácido sulfúrico y posterior derivatización (Figura 4.18, Tabla 4.11). La glucosa fue el componente principal de las fracciones, así como

del pustulano, lo que indica que la naturaleza de las fracciones es de tipo glucano, como ya se podía deducir por la metodología de extracción de dichas fracciones y por el tratamiento con periodato. Tanto la fracción P-1 como la P-2 presentaron una pequeña cantidad de manosa, cuyo origen pudiera estar en las manoproteínas de la pared.

Tres tipos de análisis estructurales se realizaron de las fracciones, haciendo mayor incapié en la fracción P-1. Del tratamiento con periodato sódico y posterior valoración del ácido fórmico liberado, se pudo deducir la presencia de glucanos de tipo (1→6) en ambas fracciones (Tabla 4.12). Sin embargo, la fracción P-2 estuvo formada, en su mayor parte (75.6%), por enlaces de tipo (1→3), mientras en la fracción P-1 un 84.8% fueron enlaces de tipo (1→6). Si relacionamos la capacidad de adsorción de las dos fracciones con su contenido en enlaces (1→6) se puede observar que la fracción P-1, rica en estos enlaces, presentó una capacidad de adsorción mayor que la fracción P-2 que presenta una menor capacidad de unirse a la toxina. Este resultado confirmaría que la naturaleza del receptor de la toxina en la pared de *C. boidinii* serían los glucanos con enlaces de tipo (1→6). Los estudios de espectrometría infrarroja determinaron la existencia en ambas fracciones de anómeros de glucosa en configuración β , lo que denota la banda de absorción a 890 cm^{-1} (Figura 4.19). En último lugar para realizar una caracterización más exhaustiva y confirmar los resultados anteriores se realizó con la fracción P-1 un espectro de ^1H -RMN. Las señales entre 4.5 y 4.6 ppm confirman la existencia de enlaces de tipo β -(1→6) en dicha fracción (Figura 4.20). De este modo, el receptor primario de la toxina de *P. membranifaciens* en la pared de *C. boidinii* estaría formado por glucanos de tipo β -(1→6) de forma similar a las toxinas K1, K2 y K3 de *S. cerevisiae*.

Esta caracterización del receptor de pared de la toxina permitió el aislamiento y purificación de la toxina *killer* como ya se ha descrito en apartados anteriores.

La velocidad de adsorción de la toxina al receptor de la misma (fracción P-1) determinada valorando la actividad *killer* residual (no unida) en el extracto ensayado, permitió observar que la toxina presenta una rápida adsorción a este receptor primario o receptor de pared. En pocos minutos (Figura 4.21) la actividad *killer* ensayada al inicio hubo desaparecido,

poniendo de manifiesto una rápida velocidad de adsorción. Estos resultados son concordantes con los resultados aportados por diversos autores (Kurzweilová & Sigler, 1994).

La obtención de protoplastos de las células de *C. boidinii* IGC 3430 permitió determinar que las células son sensibles a la acción de la toxina en ausencia de su pared, lo que pudiera indicar que la pared celular no es indispensable (y por tanto el receptor primario) para la actividad de la toxina. La toxina podría interaccionar directamente con la membrana plasmática (Kagan, 1983) o a través de un segundo receptor ubicado en esta (Martinac *et al.*, 1990).

5.7.- Efectos de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* sobre las células sensibles.

El modo de acción de las toxinas *killer* no ha quedado aun resuelto pese a los estudios realizados. De forma global se habla de una acción a nivel de la membrana plasmática como protonóforos o ionóforos, sin embargo, se han propuesto otras acciones: inhibidores de la síntesis de pared (Yamamoto, 1986), inhibidores de la síntesis de DNA (Schmitt *et al.*, 1989 y 1996), inhibidores de la adenilato ciclasa (Sugisaki, 1983; White, 1989). Es probable que debido a la heterogeneidad de las toxinas *killer* alguno de estos efectos en las células sensibles no se produzcan en todos los casos, y que algunos de ellos sean consecuencias más o menos directas de otros. Sin embargo, parece claro que el mecanismo más aceptado relaciona a ciertas toxinas *killer* con procesos ocurridos en la membrana plasmática (de la Peña *et al.*, 1980 y 1981).

La determinación de los efectos que la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 causa en la cepa sensible *C. boidinii* IGC 3430 comenzó analizando la cinética de muerte celular en presencia de la toxina. En la Figura 4.23 se puede observar la existencia de una fase de latencia de aproximadamente una hora desde la aplicación de la toxina hasta que aparecen los primeros indicios de muerte celular; desde ese momento, comienza una fase de muerte celular, que en 9 horas hace disminuir la población en algo más del 90%. La tasa de muerte en las condiciones empleadas fue de 0.401 h^{-1} . La fase de latencia en la cual la toxina no produce aun muerte celular, varía según los autores: 20 minutos (Kurzweilová & Sigler,

1995b), 40 min - 1 hora (de la Peña *et al.*, 1980), 1 - 2 horas (Sawant *et al.*, 1988). Por tanto, dicha fase en nuestro estudio es similar a las descritas previamente. Sin embargo, la comparación de la efectividad de las diferentes toxinas *killer* es complicada por que depende de las condiciones de ensayo (pH, temperatura, etc), la sensibilidad de las cepas empleadas, y además, también depende de la cantidad de toxina empleada en los ensayos o de lo que es casi lo mismo la cantidad de células sensibles empleadas.

Desde que la toxina se une al receptor, proceso que se produce en pocos minutos (Kurzweilová & Sigler, 1994) y el final de la fase de latencia, tras la cual comienza a observarse muerte celular, deben producirse distintos eventos que conduzcan a dicha muerte. Estos procesos constituyen el mecanismo de acción de las toxinas *killer*.

Las primeras investigaciones para discernir el mecanismo de acción de la toxina K1 de *S. cerevisiae*, la más estudiada, aportaron que el tratamiento con toxina induce la salida de iones (Skipper & Bussey, 1977) y ATP (Bussey & Sherman, 1973; Kotani *et al.*, 1977) de las células sensibles. Estos efectos aparecen tras 20 - 80 minutos del tratamiento con toxina (Bussey & Sherman, 1973; Skipper & Bussey, 1977; Bussey, 1981; Kurzweilová & Sigler, 1995b). Desde ese momento empieza a observarse muerte celular por lo que los efectos descritos pueden ser debidos a ciertos efectos primarios según de la Peña *et al.*, 1980. En estas investigaciones de la Peña *et al.*, 1980 y 1981 describen los procesos ocurridos inmediatamente después de la unión de la toxina a las células sensibles. La toxina inhibiría el bombeo de protones desde la célula al medio y esto impediría rápidamente el cotransporte de aminoácidos al interior de la célula. Este proceso mediaría sin que la actividad ATPasa de membrana disminuyese.

Estas conclusiones hacen pensar que la toxina *killer* podría actuar en la célula sensible de forma similar a como lo hacen las colicinas (Fields & Luria, 1969; Schein *et al.*, 1978; de la Peña *et al.*, 1981). Tras estas investigaciones la cuestión por resolver era si la toxina inhibía o actuaba sobre algún componente de la membrana plasmática o podía actuar directamente formando un canal transmembrana en la célula. El carácter anfipático de la toxina K1 sugiere que esta podría actuar directamente sobre la membrana (Bostian *et al.*, 1984). Martinac *et al.*

en 1990 determinan que la toxina K1 forma canales *in vivo* en esferoplastos de células sensibles e *in vitro* en liposomas. Los canales formados presentarían la característica de poder ser atravesados de forma indistinta por iones como K^+ , Na^+ . Otros iones como Ca^{2+} , Cl^- pasarían más difícilmente, por lo que parece claro que los canales formados por la toxina serían para cationes monovalentes. Análogamente, Kagan (1983) empleando la toxina de *P. kluyveri* demuestra la formación de canales para iones *in vitro* en bicapas lipídicas. Posteriormente, Schmitt & Compain (1995) determinan mediante una aproximación bioquímica y genética la existencia de un receptor secundario a nivel de la membrana plasmática. Los mutantes (*KRE12*) carentes de este receptor (proteína) en la membrana presentan una mayor resistencia a la acción de la toxina por lo que pudiera estar implicado en la acción de esta. La proteína-receptor actuaría permitiendo a la toxina adherirse a la membrana (*docking protein*) y formar los canales por los cuales según Martinac *et al.*, 1990, pasarían los iones K^+ y Na^+ .

Los eventos anteriormente detallados describen la acción de cierto tipo de toxinas (K1, toxina de *P. kluyveri*, etc). Otras toxinas, encabezadas por la toxina KT28 de *S. cerevisiae* y la toxina de *K. lactis* presentan un mecanismo de acción diferente (Sugisaki, 1983; White, 1989; Schmitt *et al.*, 1989; Butler *et al.*, 1991, Schmitt & Compain, 1995 y Schmitt *et al.*, 1996). Estas toxinas actúan deteniendo el ciclo celular de las células sensibles en la fase G1. Las primeras tentativas para determinar la acción de este tipo de toxina (*K. lactis*) indicaron que el mecanismo estaría relacionado con una inhibición de la adenilato ciclasa (Sugisaki *et al.*, 1983); investigaciones posteriores (White *et al.*, 1989) descartan esta inhibición, dejando nuevamente el mecanismo de esta toxina por resolver. La acción de este tipo de toxinas sería más lenta que las anteriormente descritas (K1, etc) ya que sólo tras 1 - 2 horas la acción de la toxina causa la muerte celular; sin embargo, la síntesis del DNA se detiene rápidamente en las células sensibles. El efecto más evidente de la acción de estas toxinas es la acumulación de células en fase G1 del ciclo celular. El mecanismo por el cual interfieren con el ciclo celular es aun desconocido (Schmitt *et al.*, 1996).

Para discernir que tipo de sucesos son los causantes de la muerte de las células de *C. boidinii* por acción de la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106, en primer lugar se determinó la evolución de la integridad de la membrana plasmática de las células sensibles

tras el tratamiento con toxina (Figura 4.24). Las células tratadas durante 4 horas, pese a no ser viable un 30% de la población, no presentaron permeabilidad al yoduro de propidio. Sólo a tiempos de incubación mayores se observó la aparición de células teñidas. La interpretación a este hecho pudiera ser que pese a que las células, debido a la acción de la toxina, no presentasen capacidad para volver a dividirse y generar colonias, la integridad física de la membrana pudiera permanecer intacta y por ello, el fluorocromo no pudiera penetrar a través de la membrana. Por otro lado, parece improbable la posibilidad de que el colorante pudiera pasar a través de membrana por los canales producidos por la toxina (en el caso supuesto de que este fuera el mecanismo de acción de esta toxina *killer*). Como ya se ha comentado, los canales iónicos que las toxinas *killer* son capaces de generar en las membranas/liposomas poseen cierta especificidad de modo que, prácticamente, sólo los cationes monovalentes pasan a través de ellos. El yoduro de propidio, además, tiene una masa molecular (668.4) varias veces superior a estos iones. Este hecho contradice los resultados de ciertos autores (Kurzweilová & Sigler, 1993b y 1995a) que usando púrpura de bromocresol determinan la muerte celular por acción de las toxinas *killer*. Sin embargo, otros autores (Vondrejs *et al.*, 1996) observan que la acción de algunas toxinas no permite detectar la muerte celular con este tipo de tinciones fluorescentes. En favor, de Kurzweilová & Sigler cabe destacar el hecho de las toxinas estudiadas por estos otros autores son las producidas por *K. lactis* cuya acción, como ya se ha comentado, no está relacionada con acontecimientos directos en la membrana plasmática sino con la síntesis de DNA y el proceso de gemación. Por otro lado, basándonos en experiencias previas de estudios de muerte celular por calor, realizadas en nuestro grupo, que correlacionaban las medidas de UFC/ml con los recuentos microscópicos empleando tinciones vitales (Trypan blue), se pudo llegar a la conclusión de que no existe una buena correlación entre ambos métodos. Haciendo extensivas este tipo de observaciones, los resultados obtenidos pudieran en parte ser explicados en este sentido.

Uno de los mecanismos propuestos para las toxinas *killer* es su acción a nivel de la membrana plasmática como desestabilizadores del gradiente electroquímico de esta. Por esta razón se estudiaron los efectos causados por la toxina en el pH intracelular y en el movimiento de ciertos iones como el potasio y el sodio. Treinta minutos después de incubar las células con la toxina fue posible determinar la existencia de cambios a nivel del pH intracelular (Figura

4.27), así como, aunque más tardíos, cambios en la concentración de los iones sodio (Figura 4.26) y potasio (Figura 4.25). Los cambios más significativos en el pH_i ocurrieron entre 1 y 1.5 horas tras el tratamiento, mientras que los cambios más acusados en la concentración de potasio fueron algo posteriores; entre las 1.5 y 3.5 horas. Sin embargo, ambos procesos comenzaron casi de forma simultánea a los 30-60 minutos de incubación. Como ya se ha comentado, el proceso de muerte celular sólo se observó al cabo de 2 horas de tratamiento, ya que durante la primera hora del mismo existió cierto crecimiento de la población. Por lo tanto, los cambios a nivel de pH y concentraciones de sodio y potasio pudieran ser los responsables del proceso de muerte celular, cuando estos parámetros alcanzasen valores incompatibles con la vida de las células.

Comparando el proceso de muerte celular con la variación del pH_i se ha observado que a partir de un pH inferior a 5.0 se produce el proceso de muerte de las células. Durante el periodo inicial de la fase de latencia (0 - 1h) se observa una disminución en el pH_i de las células (de pH 6.46 a 6.12) sin efectos en la viabilidad (incluso se observa crecimiento). Es a partir de la primera hora cuando los efectos son más evidentes; se puede observar el inicio de la fase de muerte celular acompañado de un descenso brusco en el pH_i de las células (de pH 6.12 a 5.05). El pH_i de las células no tratadas con toxina estuvo comprendido entre 6.4 y 6.5 durante todo el proceso. El valor de pH_i calculado en *S. cerevisiae* es de 6.42 para un pH externo de 4.6 (de la Peña *et al.*, 1981). El pH_i final de las células tratadas con toxina alcanzó un valor de 4.65 - 4.7, para un valor de pH externo de 4.0. La relación entre pH_i y viabilidad celular es un hecho demostrado; Imai & Ohno, (1995) establecen esta relación en *S. cerevisiae*. A un pH externo de 3.0, una unidad de pH inferior a la ensayada en el presente trabajo, estos autores observan una relación lineal entre pH_i y viabilidad celular. Un 40 - 50% de viabilidad de las células se correspondería con un valor de pH_i de 5.5 - 5.6. Por tanto, la disminución en la viabilidad de la población podría ser explicada en función de la disminución observada en el pH_i . Resultados similares (Middelbeek *et al.*, 1980) han sido observados para la toxina de *P. kluyveri*. La disminución en el pH intracelular ha sido observada, en este caso, a partir de los 60 minutos del tratamiento con toxina; el pH_i disminuyó hasta estabilizarse a valores cercanos a 5.2 (pH externo 4.3) al cabo de las 3 horas. Los datos de estos autores son similares a los aquí presentados, en términos de tiempo en aparecer los cambios en el pH_i y

en tiempo en estabilizarse la disminución del pH (3 horas). La disminución del pH_i fue, sin embargo, mayor en nuestro caso (6.4 - 4.7) a la observada por estos autores (6.5 - 5.2); la explicación a este hecho podría venir de las diferencias en los tampones empleados (pH y molaridad), el empleo de NaCl en nuestro caso y la diferente actividad *killer* de las toxinas.

Las células de levadura mantienen una elevada concentración de potasio intracelular cuando crecen en medios salinos. Este ión está implicado en numerosos procesos celulares. Cuando las células de *C. boidinii* crecidas en un medio con KCl (0.05%) fueron expuestas a la acción de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* se pudo observar la salida de K⁺ en un periodo de 30 minutos. Sin embargo, esta salida fue comparable a la observada en las células control, por lo que puede ser atribuida a una adaptación a los cambios introducidos en el medio (eliminación del medio en el que las células fueron pre-crecidas y sustitución por el mismo medio sin potasio (Middelbeek *et al.*, 1980)). Los efectos más notorios en la salida de K⁺ se observaron entre las 1.5 y 3.5 horas después del tratamiento. Por tanto, el efecto sobre los *pools* de K⁺ parece posterior a la disminución en el pH intracelular. Nuevamente, estos resultados serían coincidentes con los aportados por Middelbeek *et al.*, (1980). Estos autores observan que la salida de K⁺ de las células sensibles se produce entre los 60 y 90 minutos después de incubar con la toxina de *P. kluyveri*, es decir, de forma simultánea al descenso en el pH_i. En nuestro caso, como ya se ha comentado, parece que ambos procesos no serían del todo simultáneos; aunque las diferencias encontradas en la salida de potasio y en la acidificación intracelular, bien podrían atribuirse a las diferentes metodologías empleadas para la determinación de ambos procesos.

Existen toxinas *killer* cuya acción no está relacionada, o al menos directamente, con la generación de un desequilibrio en el potencial de membrana y los diferentes aspectos ya desarrollados anteriormente. Estas toxinas son la toxina 28 de *S. cerevisiae* y la toxina producida por *K. lactis* (Sugisaki *et al.*, 1983; White *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1989; Butler *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 1996). Pese a que en un principio la actividad de la toxina de *K. lactis* se relacionó con una inhibición de la adenilato ciclasa (Sugisaki *et al.*, 1983; White *et al.*, 1989) actualmente se piensa que tiene un mecanismo de acción similar al de la toxina KT28 de *S. cerevisiae*. Ambas toxinas bloquean en las células sensibles su síntesis de DNA

en la fase G1 del ciclo celular. Como consecuencia de esta acción, las células tratadas no pueden sintetizar DNA y quedan con un contenido haploide (n) de DNA. Hemos investigado en las células de *C. boidinii* la posibilidad de que la toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106 fuese capaz de generar estos efectos. El análisis por citometría de flujo del contenido en DNA de las células tratadas con toxina inactivada (control) permitió determinar la evolución de la población en las condiciones de experimentación utilizadas. La experiencia se realizó empleando células en fase exponencial de crecimiento, lo que puede observarse claramente en las primeras muestras analizadas, en las que se observan dos picos de diferente contenido en ADN; puesto que *C. boidinii* es una levadura haploide estos máximos corresponderían con células con un contenido de ADN " n " (células individuales) y " $2n$ " (células en gemación). Las células analizadas a tiempo cero presentaron 2 picos, siendo algo mayor el pico correspondiente a un contenido " $2n$ " de ADN, lo que indica un crecimiento muy activo de las células. Este pico " $2n$ " disminuye de tamaño con el tiempo siendo a las 12 horas menor que el de contenido " n "; a las 24 horas el pico " $2n$ " casi no existe indicando esto que las células están en una fase estacionaria de crecimiento (Figura 4.29a). Análogamente, se realizó la misma experiencia en presencia de toxina activa con células sensibles en dos fases de crecimiento distintos (exponencial y estacionario). De los resultados obtenidos (Figuras 4.29b y 4.29c) se concluye que la toxina no detiene el ciclo celular en una fase concreta como en el caso de las toxinas KT28 y de *K. lactis*, ya que no se acumulan células en ninguna fase concreta del ciclo; sino parece detener el ciclo celular de las células sensibles independientemente de la fase del ciclo e independientemente de la fase de crecimiento (exponencial o estacionario).

Los resultados obtenidos, aun estando en nuestro grupo determinados en la realización de nuevas experiencias para concluir y reforzar las presentadas en esta memoria de Tesis Doctoral, nos hacen concluir que la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 presenta características similares a otras toxinas *killer* ya caracterizadas en levaduras. Sus características físico-químicas (actividad, estabilidad, masa molecular, punto isoeléctrico, etc), los efectos causados en las células sensibles, etc, nos hacen pensar que dicha toxina presenta características parecidas al grupo de toxinas encabezadas por la toxina K1 de *S. cerevisiae* que ha sido estudiada exhaustivamente. La característica peculiar de la toxina estudiada, su

actividad *killer* dependiente de NaCl/KCl, parece estar más relacionada con la sensibilidad de las células a su acción que con la propia actividad de esta toxina, ya que existen células sensibles a la acción de esta toxina en ausencia de NaCl/KCl (*K. lactis* IGC 4358) (Llorente *et al.*, 1997). En la presente memoria de Tesis Doctoral concluimos que la acción de la toxina *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1106 sobre *C. boidinii* IGC 3430 se produce sólo en presencia de NaCl debido probablemente a la acción tóxica que tiene el sodio en las células, lo que habría sido demostrado por la entrada de este ión al interior de las células sensibles en presencia de toxina. Discernir por qué ciertas cepas son sensibles sólo en presencia de sal y otras no, es un problema no resuelto. Cierta hipótesis de partida para explicar esta diferencia podría ser la presencia de un diferente número de receptores en unas células y otras, lo que podría hacer más sensibles a las que más receptores tuvieran, por lo que no sería necesario el efecto potenciador de la sal. Otra posible explicación podría ser la presencia de ciertos cambios (membrana plasmática, pared celular, etc) en las células sensibles en presencia de sal, cambios que las hicieran sensibles a la acción de la toxina *killer*. Todas estas hipótesis son, junto con otras, líneas de trabajo que serán continuadas en el futuro en nuestro grupo de investigación encabezado por el Dr. Martínez Peinado, con la inestimable colaboración de la Dra. Spencer-Martins.

VI.- CONCLUSIONES

1.- Las cinéticas de crecimiento y de producción de toxina estudiadas indican que la producción de toxina *killer* de *Pichia membranifaciens* CYC 1106 se desarrolla durante la fase exponencial de crecimiento, y termina en el inicio de la fase estacionaria.

2.- Las condiciones de cultivo más idóneas para la producción de toxina *killer* fueron 20°C, pH 4.0 y 150 rpm. En estas condiciones el empleo de detergentes no iónicos mejoró significativamente la obtención de toxina.

3.- La toxina *killer* de *P. membranifaciens* presentó actividad sólo en presencia de NaCl o KCl. La temperatura óptima de actividad fue inferior a 25°C y su pH óptimo de actividad estuvo comprendido entre 3 y 4.5 unidades de pH. La toxina se mostró estable sólo a valores de temperatura inferiores a 25°C y a valores de pH inferiores a 4.8 unidades. El empleo de concentraciones de NaCl del 3 y 6% disminuyó dicha estabilidad.

4.- El receptor de la toxina presente en la pared de la levadura sensible unido a un soporte cromatográfico permitió la purificación a homogeneidad de la toxina. Dicha toxina presentó una masa molecular aparente en electroforesis desnaturalizante de 18.000 Da, no mostrando carácter glicoprotéico. Su punto isoeléctrico fue de 3.91 unidades. La información genética para la síntesis de la toxina parece estar localizada a nivel cromosómico debido a la ausencia de plásmidos.

5.- El fraccionamiento químico de la pared de la levadura sensible en sus componentes esenciales permitió conocer la naturaleza del receptor primario de la toxina. La fracción P-1, obtenida en dicho fraccionamiento, fue la más eficaz en retener la toxina *killer*. El análisis químico y estructural de dicha fracción permitió determinar que los glucanos de tipo β -(1→6) son los receptores para la toxina en la pared de la levadura sensible.

6.- Los protoplastos tratados con toxina *killer* presentaron tasas de regeneración inferiores a los tratados con toxina inactivada, indicando que la pared de la levadura sensible no es indispensable para la acción de la toxina. Esto sugiere que la toxina podría actuar interaccionando con un segundo receptor presente en la membrana plasmática o directamente sobre ella.

7.- Los efectos de la toxina *killer* en las células sensibles fueron similares a los causados por toxinas del tipo K1 de *S. cerevisiae*. La acción de la toxina produjo una rápida disminución del pH intracelular desde 6.5 a 4.6 acompañada de una entrada de iones Na^+ y una salida de K^+ en las células.

8.- El efecto de la toxina no permitió observar variaciones en el ciclo celular ni en el contenido de ADN de las células sensibles; por tanto, la acción de la toxina producida por *Pichia membranifaciens* CYC 1106 difiere de las toxinas del tipo KT28 de *S. cerevisiae*.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Al-Aidroos, K. & Bussey, H. (1978).** Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Canadian Journal of Microbiology*. **24**, No.3, 228-237.
- Antuch, W., Güntert, P. & Wüthrich, K. (1996).** Ancestral β -crystallin precursor structure in a yeast killer toxin. *Nature Structural Biology*. **3**, No. 8, 662-665.
- Ashida, S., Shimazaki, T., Kitano, K. & Hara, S. (1983).** New killer toxin of *Hansenula mrakii*. *Agricultural and Biological Chemistry*. **47**, No.12, 2953-2955.
- Bacon, J.S.D. (1981).** Nature and disposition of polysaccharides within the cell envelope. En: *Yeast Cell Envelopes, Biophysics, and Ultrastructure*. 65-84.
- Barker, S.A., Bourne E.J. & Whiffen, D.M. (1956).** Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods of Biochemical Analysis*. **3**, 213-245.
- Bevan, E.A. & Somers, J.M. (1969).** Somatic segregation of the killer (k) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinants in yeast. *Genetics Research*. **14**, 71-77.
- Bevan, E.A., Herring, A.J. & Mitchell, D.J. (1973).** Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature*. **245**, 81-86.
- Bevan, E.A. & Mitchell, D.J. (1969).** The killer system in yeast. *Viruses and Plasmids of Fungi*. **1**, 161-199.
- Boyer, M.J. & Hedley, D.W. (1994).** Measurement of intracellular pH. *Methods in Cell Biology*. **41**, 135-148.
- Bostian, K.A., Hopper, J.E., Rogers, D.T., & Tipper, D. (1980).** Translational analysis of the killer-associated virus-like particle ds RNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*: M-ds RNA encodes toxin. *Cell*. **19**, 403-414.
- Bostian, K.A., Jayachandran, S. & Tipper, D. (1983).** A glycosylated protoxin in killer yeast: models for its structure and maturation. *Cell*. **32**, 169-180.
- Bostian, K.A., Elliott, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A. & Tipper, D.J. (1984).** Sequence of the preprotoxina dsRNA gene of type 1 killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*. **36**, 741-751.
- Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A. & Bussey, H. (1990).** Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall β -glucan assembly. *Journal of Cell Biology*. **110**, 1833-1843.

Brizzard, B.L. & de Kloet, S. (1981). Superkiller yeast strain contains additional species of double-stranded RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **99**, No.4, 1449-1455.

Buck, K.W., Lhoas, P., Border, D.J. (1973). Virus particles in yeast. *Biochemical Society Transactions*. **1**, 1141-1142.

Buckler, K.J. & Vaughan-Jones, R.D. (1990). Application of a new pH-sensitive fluoroprobe (carboxy-SNARF-1) for intracellular pH measurement in small, isolated cells. *Pflügers Arch.* **417**, 234-239.

Bussey, H. (1972). Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nature New Biology*. **235**, 73-75.

Bussey, H. & Sherman, D. (1973). Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochimica and Biophysica Acta*. **298**, 868-875.

Bussey, H., Sherman, D., Somers, J.M. (1973). Action of yeast killer factor: a Resistant mutant with sensitive spheroplasts. *Journal of Bacteriology*. **113**, No.3, 1193-1197.

Bussey, H. (1974). Yeast killer factor-induced turbidity changes in cells and sphaeroplasts of a sensitive strain. *Journal of General Microbiology*. **82**, 171-179.

Bussey, H. & Skipper, N. (1975). Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *Journal of Bacteriology*. **124**, No.1, 476-483.

Bussey, H. & Skipper, N. (1976). Killing of *Torulopsis glabrata* by *Saccharomyces cerevisiae* killer factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **9**, No.2, 352-354.

Bussey, H., Saville, D., Hutchins, K. & Palfree, R.G.E. (1979). Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. **140**, No.3, 888-892.

Bussey, H. (1981). Physiology of killer factor in yeast. *Advances in Microbial Physiology*. **22**, 93-122.

Bussey, H., Steinmetz, O. & Saville, D. (1983). Protein secretion in yeast: two chromosomal mutants that oversecrete killer toxin in *S. cerevisiae*. *Current Genetics*. **7**, 449-456.

Bussey, H., Boone, C., Dmochowska, A., Greene, D., Zhu, H. & Lolle, S.J. (1988). Secretion and action of yeast killer toxin. In: *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*. 161-178.

Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Molecular Microbiology*. **5**, No.10, 2339-2343.

Butler, A.R., White, J.H. & Stark M.J.R. (1991). Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *Journal of General Microbiology*. **137**, 1749-1757.

Cailliez, J.C., Séguy, N., Aliouat, E.M., Polonelli, L., Camus, D. & Dei-Cas, E. (1994). The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Medical Hypotheses*. **43**, 167-171.

Cansado, J., Longo, E., Velazquez, J.B. & Villa, T.G. (1991). El caracter killer en *Kluyveromyces lactis*. En: *Temas de Microbiología. Documentos Didácticos*. Eds. Gonzalez, T., Chordi, A. 155, Vol. IV. 217-232.

Cansado, J., Velazquez, J.B., Calo, P., Sieiro, C., Longo, E., & Villa, T.G. (1992). Characterization of killer-resistant of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from spontaneous fermentations. *FEMS Microbiological Letters*. **97**, 13-18.

Carter, E.A., Paul, E.P. & Hunter, P.A. (1991). Cytometric evaluation of antifungal agents. En: *Flow Cytometry in Microbiology*. Chapter 8, 111-120.

Cuinier, M.C. & Gros, M.C. (1983). Enquete sur la repartition des levures <<killer>> en France. *Vignes Vins*. **318**, 25-27.

De Louvencourt, L., Fukuhara, H. Heslot, H. & Wesolowski, M. (1983). Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. *Journal of Bacteriology*. **154**, No.2, 737-742.

Duffus, J.H., Levi, C. and Manners D.J. (1982). Yeast cell-wall glucans. *Advances in Microbial Physiology*. **23**, 151-181.

El-Sherbeini, M. & Bostian, K.A. (1987). Viruses in fungi infection of yeast with K1 and K2 killer viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **84**, 4293-4297.

Elorza, M.V., Rico, H., Gozalbo, D. & Sentandreu, R. (1983). Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **49**, 457-469.

Elorza, M.V., Murgui, A. & Sentandreu, R. (1985). Dimorphism in *Candida albicans*: Contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *Journal of General Microbiology*. **131**, 2209-2216.

Extremiera, A.L., Martín, I. & Montoya, E. (1982). A new killer toxin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **5**, 17-19.

Fields, K.L. & Luria S.E. (1969). Effects of colicins E1 and K on cellular metabolism. *Journal of Bacteriology*. **97**, No.1, 64-77.

Fink, G.R. & Styles, C.A. (1972). Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **69**, No. 10, 2846-2849.

Fleet, G.H. & Phaff, H.J. (1973). Effect of glucanases of yeast and bacterial origin on cell walls of *Schizosaccharomyces* species. En: *Yeast, mould and plant protoplasts*. Eds. Villanueva, J.R., García-Acha, J., Gascón, S & Urubaru, F. 33-59.

Fleet, G.H. & Manners, D.J. (1976). Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. **94**, 180-192.

Fleet, G.H. (1991). Cell walls. The yeasts. Vol. 4. Yeast Organelles. Eds. Rose, A.H. & Harrison, J.S. 200-277.

Gallo, B.J., Andreotti, R., Roche, C. Ryu, D. & Mandels, M. (1978). Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG 77. *Biotechnology and Bioengineering Symp.* No.8, 89-101.

Gásková, D., Kurzweilová, H., Denksteinová, B., Herman, P., Vecer, J., Sigler, K., Plásek, J. & Malínský, J. (1994). Study of membrane potential changes of yeast cells caused by killer toxin K1. *Folia Microbiologica*. **39**, 516-517.

Ghose, T.K. & Sahal, V. (1979). Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. *Biotechnology and Bioengineering*. **21**, 283-296.

Gockowiak, H. (1986). The significance of zymocidal yeast in winemaking. En: *Proceedings of Sixth Australian Wine Industrial Technology Conference*. Adelaide. Eds. Lee, T. 103-106.

Goldstein, I.J., Hay, G.W., Lewis, B.A. & Smith, F. (1965). Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. **5**, 361-370.

Golubev, W.I. (1998). Mycocins (Killer Toxins). En: *The yeast, a taxonomic study*. Capítulo 8. Eds. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 55-62.

Gopal, P.K., Shepherd, M.G. & Sullivan, P.A. (1984). Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. **130**, 3295-3301.

Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. & Sakaguchi, K. (1981). Isolation and characterization of linear desoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*. **145**, No.1, 382-390.

Gunge, N., Murata, K. & Sakaguchi, K. (1982). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with linear DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*. **151**, No.1, 462-464.

Gunge, N. (1983). Yeast DNA plasmids. *Annual Reviews of Microbiology* **37**, 253-276.

Gunge, N., Fukuda, K., Morikawa, S., Murakami, K., Takeda, M. & Miwa, A. (1993). Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Genetics*. **23**, 443-449.

Hara, S., Iimura, Y., Oyama, H., Kozeki, T., Kitano, K. & Otsuka, K. (1981). The breeding of cryophilic killer wine yeasts. *Agricultural and Biology and Chemistry*. **45**, 1327-1334.

Hay, G.W., Lewis, B.A. & Smith, F. (1965). Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. En: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. **5**, 357-360.

Hayman, G.T. & Bolen, P.L. (1991). Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Current Genetics* **19**, 389-393

Heard, G.M. & Fleet, G.H. (1987). Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**, 539-545.

Herring, J.A. & Bevan, E.A. (1974). Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Virology*. **22**, 387-394.

Herring, J.A. & Bevan, E.A. (1977). Yeast virus-like particles possess a capsid-associated single-stranded RNA polymerase. *Nature*. **268**, 464-466.

Hidalgo, P. & Flores, M. (1994). Occurrence of the killer character in yeasts associated with Spanish wine production. *Food Microbiology*. **11**, 161-167.

Hodgson, V.J., Button, D. & Walker G.M. (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*. **141**, 2003-2012.

Hutchins, K. & Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)-β-D-glucan. *Journal of Bacteriology*. **154**, No.1, 161-169.

Imai, T. & Ohno T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, No.10, 3604-3608.

Jacobs, C.J., Fourie, I. & van Vuuren, H.J.J. (1988). Occurrence and detection of killer yeasts on chenin blanc grapes and grape skins. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. **9**, No.2, 28-31.

Jacobs, C.J. & van Vuuren, H.J.J. (1991). Effects of different killer yeasts on wine fermentation. *American Journal for Enology and Viticulture*. **42**, No.4, 295-300.

Janderová, B., Gásková, D. & Bendová, O. (1995). Consequences of *Sporidiobolus pararoseus* killer toxin action on sensitive cells. *Folia Microbiologica*. **40**, No.2, 165-167.

Javadekar, V.S., SivaRaman, H. & Gokhale, D.V. (1995). Industrial yeast strain improvement: construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *Journal of Industrial Microbiology*. **15**, 94-102.

Kagan, B.L. (1983). Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayers. *Nature*. **302**, 709-711.

Kandel, J.S. & Stern, T.A. (1979). Killer phenomenon in pathogenic yeast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **15**, No. 4, 568-571.

Kasahara, S., Inoue, S.B., Mio, T., Yamada, T., Nakajima, T., Ichisima, E., Furuichi, Y. & Yamada, H. (1994). Involvement of cell wall β -glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Letters*. **348**, 27-32.

Kitamoto, H.K., Ohmomo, S. & Nakahara, T. (1993). Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *Journal of Dairy Science*. **76**, No.3, 803-811.

Koltin, Y. & Day, P.R. (1975). Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins. *Applied Microbiology*. **30**, No.4, 694-696.

Kollár, R., Petrásková, E., Ashwell, G., Robbins, P.W. & Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**, No.3, 1170-1178.

Komiyama, T., Ohta, T., Furuichi, Y., Ohta, Y. & Tsukada, Y. (1995). Structure and activity of HYI killer from *Hansenula saturnus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **18**, No.8, 1057-1059.

Komiyama, T., Ohta, T., Urakami, H., Shiratori, Y., Takasuka, T., Satoh, M., Watanabe, T. & Furuichi, Y. (1996). Pore formation on proliferating yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell buds by HM-1 killer toxin. *Journal of Biochemistry*. **119**, 731-736.

Kono, I. & Himeno, K. (1997). A novel killer yeast effective on *Schizosaccharomyces pombe*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. **61**, No.3, 563-564.

Kotani, H., Shinmyo, A. & Enatsu, T. (1977). Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'- diphosphate and calcium ion on killing action. Journal of Bacteriology. **129**, No.2, 640-650.

Kurtzman, C.P. (1984). Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. Antonie van Leeuwenhoek. **50**, 209-217.

Kurzweilová, H. & Sigler, K. (1993a). Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1. Folia Microbiologica. **38**, 524-526.

Kurzweilová, H. & Sigler, K. (1993b). Fluorescent staining with bromocresol purple: a rapid method for determining yeast cell dead count developed as an assay of killer toxin activity. Yeast. **9**: 1207-1211.

Kurzweilová, H. & Sigler, K. (1994). Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. Archives of Microbiology. **162**, 211-214.

Kurzweilová, H. & Sigler, K. (1995a). Comparison of three different methods for determining yeast killer toxin K1 activity and standardisation of units. Experientia. **51**, 26-28.

Kurzweilová, H. & Sigler, K. (1995b). Significance of the lag phase in K1 killer toxin action on sensitive yeast cells. Folia Microbiologica. **40**, 213-215.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature. **227**, 680-685.

Laine, R.A., Esselman, W.J. & Sweeley, C.C. (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. En: Methods in Enzymology. **28**, 159-167. Eds. Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. Academic Press. New York/London.

Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M. & Spencer-Martins, I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. Applied and Environmental Microbiology. **63**, No.3, 1165-1167.

Makower, M. & Bevan, E.A. (1963). The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Proceedings of the 11th International Congress of Genetics. **1**, 202-203.

Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C. (1973a). The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from yeast cell walls. Biochemical Journal. **135**, 19-30.

Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C., Björndal, H., & Lindberg, B. (1973b). The structure of a β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal*. **135**, 31-36.

Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C. (1974). The heterogeneity of glucan preparations from the walls of various yeasts. *Journal of General Microbiology*. **80**, 411-417.

Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M. & Spencer-Martins, I. (1992). Characterization of the yeast populations in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*. **14**, 279-283.

Marquina, D., Toufani S., Llorente, P., Santos, A. & Peinado, J.M. (1997). Killer activity in yeast isolates from olive brines. *Advances in Food Sciences (CMTL)*. **19**, No. 1/2, 41-46.

Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X., Culbertson, M., Bussey, H. & Kung, C. (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **87**, 6228-6232.

Martínez-Zaguilán, R., Martínez, G.M., Lattanzio, F. & Gillies, R.J. (1991). Simultaneous measurement of intracellular pH and Ca^{2+} using the fluorescence of SNARF-1 and fura-2. *American Physiological Society*. **260**, 297-307.

McCracken, D.A., Martin, V.J., Stark, M.J.R. & Bolen, P.L. (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin *kluyveromyces lactis*. *Microbiology*. **140**, 425-431.

Middelbeek, E.J., Hermans, J.M.H. & Stumm, C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek*. **45**, 437-450.

Middelbeek, E.J., Stumm, C. & Vogels, G.D. (1980a). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie van Leeuwenhoek*. **46**, 205-220.

Middelbeek, E.J., van de Laar, H.H.A.M., Hermans, J.M.H., Stumm, C. & Vogels, G.D. (1980b). Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action. *Antonie van Leeuwenhoek*. **46**, 483-497.

Mitchell, D.J., Bevan, E.A. & Herring, A.J. (1973). The correlation between ds-RNA in yeast and the "killer" character. *Heredity*. **31**, 133-134.

Mitchell, D.J., Herring, A.J. & Bevan, E.A. (1976). The genetic control of ds-RNA virus-like particles associated with *Saccharomyces cerevisiae* killer yeast. *Heredity*. **37**, 129-134.

Morace, G., Archibusacci, C., Sestito, M. & Polonelli, L. (1984). Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. *Mycopathologia*. **84**, 81-85.

Musgrove, E., Rugg, C. & Hedley, D. (1986). Flow cytometry measurement of cytoplasmic pH: A critical evaluation of available fluorochromes. *Cytometry*. **7**, 347-355.

Naumov, G. I. & Naumova, T.I. (1973). Comparative genetics of yeast XIII. Comparative study of killer strains of *Saccharomyces* from different collections. *Genetika*. **9**, 140-145.

Niwa, O., Sakaguchi, K. & Gunge, N. (1981). Curing of killer deoxyribonucleic acid plasmids of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*. **148**, No. 3, 988-990.

Ohta, Y., Tsukada, Y. & Sugimori, T. (1984). Production, purification and characterization of HYI, an antiyest substance, produced by *Hansenula saturnus*. *Agricultural and Biological Chemistry*. **48**, 903-908.

Oliver, S.G., McCready, S.J., Holm, C., Sutherland, P.A., McLaughlin, C.S. & Cox, B.S. (1977). Biochemical and Physiological studies of the yeast virus-like particle. *Journal of Bacteriology*. **130**, No.3, 1303-1309.

Ouchi, K., Wickner, R.B., Toh-e, A. & Akiyama, H. (1976). Breeding of killer yeast for *sake* brewing by cytoduction. *Journal of Fermentation Technology*. **57**, No.6, 483-487.

Ouchi, K., Kawase, N., Nakano, S. & Akiyama, H. (1978). Stabilization of yeast killer factor by glycerol. *Agricultural and Biology and Chemistry*. **42**, 1-5.

Palfree, G.E. & Bussey, H. (1979). Yeast killer toxin: Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. **93**, 487-493.

Palpacelli, V., Ciani, M. & Rosini, G. (1991). Activity of a different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiology Letters*. **84**, 75-78.

de la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Ramos, S. & Lazo, P.S. (1980). Primary effects of yeast killer toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **96**, No.2, 544-550.

de la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Lazo, P.S. & Ramos, S. (1981). Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. **256**, No.20, 10420-10425.

Petering, J.E., Symons, M.R., Langridge, P. & Henschke, P.A. (1991). Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, No.11, 3232-3236.

Pfeiffer, R.G.E. & Radler, F. (1979). Yeast killer toxin: purification and characterization of protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. **93**, 487-493.

Pfeiffer, P. & Radler, F. (1982). Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Strain 28. *Journal of General Microbiology*. **128**, 2699-2706.

Pfeiffer, P. & Radler, F. (1984). Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K₂. *Archives of Microbiology*. **137**, 357-361.

Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G. & Hänel, H. (1988). Effect of a *killer* toxin of yeast on eucariotic systems. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, No.4, 1068-1069.

Phaff, H.J. (1963). Cell wall of yeasts. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 17. 15-30.

Philliskirk, G. & Young, T.W. (1975). The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek*. **41**, 147-151.

Pietras, D.F. & Bruenn, J.A. (1976). The molecular biology of yeast killer factor. *International Journal of Biochemistry*. **7**, 173-179.

Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M. & Morace, G. (1983). Killer system a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. **17**, 774-780.

Provost, F., Polonelli, L., Conti, S., Fisicaro, P., Gerloni, M. & Boiron, P. (1995). Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**, 8-10.

Puhalla, J.E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*. **60**, 461-474.

Radler, F., Pfeiffer, P. & Dennert, M. (1985). Killer toxins in new isolates of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiology Letters* **29**, 269-272.

Radler, F. & Schmitt, M. (1987). Killer toxins of yeasts: Inhibitors of fermentation and their adsorption. *Journal of Food Protection*. **50**, No.3, 234-238.

Radler, F., Schmitt, M.J. & Meyer, B. (1990). Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. Archives of Microbiology. **154**, 175-178.

Radler, F., Herzberger, S. & Schwarz, P. (1993). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. Journal of general Microbiology **139**, 495-500.

Rogers, D., & Bevan, E.A. (1978). Group classification of killer yeasts based on cross-reactions between strains of different species and origin. Journal of General Microbiology. **105**, 199-202.

Rogers, H.J., Perkins, H.R. and Ward, J.B. (1980). Biosynthesis of wall components in yeast and filamentous fungi. En: Microbial Cell Walls and Membranes. Eds. Rogers, H.J., Perkins, H.R. & Ward, J.B. 478-505.

Rosini, G. (1983). The occurrence of killer characters in yeasts. Canadian Journal of Microbiology. **29**, 1462-1464.

Rosini, G. (1985). Interaction between killer strains of *Hansenula anomala* var. *anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast species. Canadian Journal of Microbiology. **31**, 300-302.

Sawant, A.D., Abdelal, A.T. & Ahearn, D.G. (1988). Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. Applied and Environmental Microbiology. **54**, No.5, 1099-1103.

Sawant, A.D., Abdelal, A.T. & Ahearn, D.G. (1989). Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC65. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **33**, 48-52.

Schein, S.A., Kagan, B.L. & Finkelstein, A. (1978). Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. Nature. **276**, 159-163.

Schmitt, M. & Radler, F. (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. Journal of General Microbiology. **28**, 3347-3354.

Schmitt, M. & Radler, F. (1988). Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. **170**, 2192-2196.

Schmitt, M. & Radler, F. (1989). Purification of yeast killer toxin KT28 by receptor-mediated affinity chromatography. Journal of Chromatography. **469**, 448-452.

Schmitt, M., Brendel, M., Schwarz, R. & Radler, F. (1989). Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. Journal of General Microbiology. **135**, 1529-1535.

Schmitt, M.J. & Compain, P. (1995). Killer-toxin-resistant *kre12* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Archives in Microbiology*. **164**, 435-443.

Schmitt, M.J., Klavehn, P., Wang, J., Schöning, I. & Tipper, D.J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*. **142**, 2655-2662.

Séguy, N., Aliouat, E.M., Dei-Cas, E., Polonelli, L., Camus, D. & Cailliez, J.C. (1994). Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J. Euk. Microbiol. Workshops on Opportunistic Protists*. **41**, 109S.

Séguy, N., Cailliez, J.C., Polonelli, L., Dei-Cas, E. & Camus, D. (1996). Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. *Parasitology Research*. **82**, 114-116.

Seki, T., Choi, E. & Ryu, D. (1985). Construction of killer wine yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**, No.5, 1211-1215.

Seksek, O., Henry-Toulmé, N., Sureau, F. & Bolard, J. (1991). SNARF-1 as an intracellular pH indicator in laser microspectrofluorometry: a critical assessment. *Analytical Biochemistry*. **193**, 49-54.

Shibata, N., Ikuta, I., Imai, T., Satoh, Y., Satoh, R., Suzuki, A., Kojima, C., Kobayashi, H., Hisamichi, K. & Suzuki, S. (1995). Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**, No.3, 1113-1122.

Shimizu, K., Adachi, T., Kitano, K., Shimazaki, T., Totsuka, A., Hara, S. & Dittrich, H. (1985). Killer properties of wine yeasts and characterization of wine killer yeasts. *Journal of Fermentation Technology*. **63**, No.5, 421-429.

Sietsma, J.H. & Wessels, G.H. (1981). Solubility of (1→3)-D/(1→6)-β-D-Glucan in fungal walls: importance of presumed linkage between glucan and chitin. *Journal of General Microbiology*. **125**, 209-212.

da Silva, G.A. (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeast in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Applied and Microbiological Biotechnology* **46**, 112-121.

Skipper, N. & Bussey, H. (1977). Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *Journal of Bacteriology*. **129**, No.2, 668-677.

Somers, J.M. & Bevan, E.A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetics Research*. **13**, 71-83.

Sommer, S.S. & Wickner, R.B. (1982). Co-curing of plasmids affecting killer double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: [HOK], [NEX], and the abundance of L are related and further evidence that M₁ requires L. *Journal of Bacteriology*. **150**, No.2, 545-551.

Sommer, S.S. & Wickner, R.B. (1984). Double-stranded RNA that encode killer toxins in *Saccharomyces cerevisiae*: unstable size of M double stranded RNA and inhibition of M₂ replication by M₁. *Molecular and Cellular Biology*. **4**, 1747-1753.

Starmer, W.T., Ganter, Ph.G. & Virginia Aberdeen, Lachance, M.A. & Phaff, H. J. (1987a). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. **33**, 783-795.

Starmer, W.T., Ganter, Ph.G. & Aberdeen, V. (1987b). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. **33**, 783-796.

Starmer, W.T., Ganter, Ph.G. & Aberdeen, V. (1992). Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, No.3, 990-997.

Sturley, S.L. & Bostian K.A. (1989). Molecular mechanisms underlying the expression and maintenance of the type 1 killer system of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and Cell Biology of Yeasts*. 247-279.

Stumm, C., Hermans, J.M.H., Middelbeek, E.J., Croes, A.F. & de Vries, G.J.M.L. (1977). Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie van Leeuwenhoek*. **43**, 125-128.

Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasaki, M. & Tamura, G. (1983). *Kluyveromyces lactis* killer toxin inhibits adenylate cyclase of sensitive yeast cells. *Nature*. **304**, 464-466.

Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasaki, M. & Tamura, G. (1984). Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Biochemistry*. **141**, 241-245.

Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasaki, M. & Tamura, G. (1985). Transfer of DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis* to *Kluyveromyces fragilis* and *Candida pseudotropicalis*. *Journal of Bacteriology*. **164**, No.3, 1373-1375.

Sullivan, P.A., Yin, C.Y., Molloy, C., Templeton, M.D. & Shepherd, M.G. (1983). An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Canadian Journal of Microbiology*. **29**, 1514-1525.

Sulo, P. & Michalcáková, S. (1992). The K3 type killer strains of genus *Saccharomyces* for wine production. *Folia Microbiologica*. **37**, No.3, 289-294.

Suzuki, C., Yamada K., Okada, N. & Nikkuni, S. (1989). Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods. *Agricultural and Biological Chemistry*. **53**, 2593-2597.

Suzuki, C. & Nikkuni, S. (1994). The primary and subunit structure of a novel killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**, No. 4, 3041-3046.

Suzuki, C., Kashiwagi, T., Tsuchiya, F., Kunishima, N, Morikawa, K. Nikkuni, S. & Arata, Y. (1997). Circular dichroism analysis of the interaction between the α and β subunits in a killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Protein Engineering*. **10**, No.2, 99-101.

Takita, M.A. & Castilho-Valavicius, B. (1993). Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast*. **9**, 589-598.

Tipper, D.J. & Bostian K.A. (1984). Double-stranded ribonucleic acid killer system in yeasts. *Microbiological Reviews*. **48**, No.2, 125-156.

Toh-e, A., Guerry, P. & Wickner, R.B. (1978). Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. **136**, No.3, 1002-1007.

Toh-e, A. & Wickner, R.B. (1979). A mutant killer plasmid whose replication depends on a chromosomal "superkiller" mutation. *Genetics*. **91**, 673-682.

Tredoux, H.G., Tracey, R.P. & Tromp, A. (1986). Killer factor in wine yeasts and its effect on fermentation. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. **7**, No.2, 105-112.

Vagnoli, P., Musmanno, A., Cresti, S., Di Maggio, T. & Coratza, G. (1993). Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, No.12, 4037-4043.

van Vuuren, H.J.J. and Wingfield, B.D. (1986). Killer yeasts - Cause of stuck fermentations in a wine cellar. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. **7**, No.2, 114-118.

van Vuuren, H.J.J. & Jacobs, C.J. (1992). Killer yeasts in the wine industry: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **43**, No.2, 119-128.

Vodkin, M., & Fink, G.R. (1974). A nucleic acid associated with a killer strain of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **70**, No.4, 1069-1072.

Vondrejs, V., Janderová, B. & Valásek, L. (1996). Yeast killer K1 and its exploitation in genetic manipulations. *Folia Microbiologica*. **41**, No.5, 379-394.

Walker, G.M., McLeod, A.H. & Hodgson, V.J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*. **127**, 213-222.

Weinstein, L.E., Capaldo-Kimball, F. & Leibowitz, M. (1993). Genetics of heat-curability of killer virus of yeast. *Yeast*. **9**, 411-418.

White, J.H., Butler, A.R. & Stark, M.J.R. (1989). *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit yeast adenylyl cyclase. *Nature*. **341**, 666-668.

Wickner, R.B. (1974). Killer character of *Saccharomyces cerevisiae*: Curing by growth at elevated temperature. *Journal of Bacteriology*. **117**, 3. 1356-1357.

Wickner, R.B. (1976). Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. *Bacteriological Reviews*. **40**, No.3, 757-773.

Wickner, R.B. & Leibowitz, M.J. (1976). Chromosomal genes essential for replication of a double-stranded RNA plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: the killer character of yeast. *Journal of Molecular Biology* **105**, 427-434.

Wickner, R.B. (1979). The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. *Plasmids*. **2**. 303-322.

Wickner, R.B. (1983). Killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*: Three distinct modes of exclusion of M₂ Double-stranded RNA by three species of double-stranded RNA, M₁, L-A-E, and L-A-HN. *Molecular and Cellular Biology*. **3**, No.4, 654-661.

Wickner, R.B. (1986). Double-stranded RNA replication in yeasts: the killer system. *Annual Reviews in Biochemistry*. **55**, 373-395.

Wieder, E.D., Hang, H. & Fox, M.H. (1993). Measurement of intracellular pH using flow cytometry with carboxy-SNARF-1^{1,2}. *Cytometry*. **14**, 916-921.

Wilson, C. & Whittaker, P.A. (1989). Factors affecting activity and stability of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**, No.3, 695-699.

Wingfield, B.D., Van Vuuren, J.J. & Pretorius, I.S. (1989). Size differentiation of M₂ genomes among K₂ killer yeasts. *Mycological Research*. **92**, 364-367.

Wingfield, B.D., Van der Meer, L.J., Pretorius, I.S. & Van Vuuren, J.J. (1990). Killer yeast is a mutant K₂ killer yeast. *Mycological Research*. **94**, 901-906.

Woods, D.R. & Bevan, E.A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. **51**, 115-126.

Woods, D.R., Ross, I.W. & Hendry, D.A. (1974). A new killer factor produced by a killer/sensitive yeast strain. *Journal of General Microbiology*. **81**, 285-289.

Worsham, P.L. & Bolen P.L. (1990). Killer toxin Production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Current Genetics*. **18**, 77-80.

Yamamoto, T., Hiratani, T., Hirata, H., Imai, M. & Yamaguchi, H. (1986). Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS-Letters*. **197**, No.1,2, 50-54.

Young, T.W. & Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek*. **44**, 59-77.

Young, T.W. (1981). The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*. **87**, 292-295.

Young, T.W. (1987). Killer Yeasts. En: *The Yeasts*. Vol 2. 2nd Edition. Yeasts and the Environment. Eds. Rose, A.H. & Harrison, J.S. 131-164.

Yu, R.J., Bishop, C.T., Cooper, F.P., Hasenclever, H.F. & Blank, F. (1967). Stuctural studies of mannans from *Candida albicans* (serotypes A and B), *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, and *Candida tropicalis*. *Canadian Journal of Chemistry*. **45**, 2207-2211.

Zhu, H., Bussey, H., Thomas, D.Y., Gagnon, J. & Bell, A.W. (1987). Determination of the carboxyl termini of the α and β subunits of yeast K1 killer toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**, No.22, 10728-10732.

Zhu, H. & Bussey, H. (1989a). The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills sphaeroplasts of many yeasts species. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**, No.8, 2105-2107.

Zhu, H. & Bussey, H. (1989b). Mutational analysis of the functional domains of yeast k1 killer toxin. *Molecular and Cellular Biology*. **11**, No.1, 175-181.

Zhu, Y., Kane, J., Zhang, X., Zhang, M. & Tipper, D.J. (1993). Role of the γ component in extression of the yeast k¹ killer phenotype. *Yeast*. **9**, 251-266.

Zorg, J., Kilian, S. & Radler, F. (1988). Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniospora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *Archives of Microbiology*. **149**, 261-267.